

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
(Direktor/in Univ.- Prof. Dr. M. Lerch)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Die Regulation der adaptiven Immunantwort im Verlauf der schweren akuten
Pankreatitis im Mausmodell**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2019

vorgelegt von: Cindy van den Brandt

geb. am: 01.04.1978

in: Ueckermünde

Dekan: Prof. Dr. med. K. Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus M. Lerch

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Zoom-Meeting

(<https://zoom.us/j/94827687837?pwd=K2tFUTl4M0wwTjl1Q1dJVzNVNGtxUT09>)

Tag der Disputation: Montag, 12. Oktober 2020, 16:00 Uhr

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Akute Pankreatitis	6
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	6
1.1.2 Ursachen.....	7
1.1.3 Diagnostik und Klinik.....	8
1.2 Rolle des Immunsystems in der akuten Pankreatitis.....	11
1.2.1 Die sterile Entzündung	11
1.2.2 Zelltod in der akuten Pankreatitis.....	12
1.2.3 Das angeborene Immunsystem	13
1.2.4 Das erworbene Immunsystem	14
1.2.5 NLRP3-Inflammasom.....	15
1.2.6 Interleukin-18	16
1.2.7 Interleukin-12	16
2 Zielsetzung.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Laborgeräte	19
3.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.3 Reagenzien und Chemikalien.....	20
3.4 Kits	21
3.5 Puffer, Medien und Lösungen	22
3.6 Software und Datenbanken	23
3.7 Mäusestämme	23
3.8 Induktion der akuten Pankreatitis	24
3.9 Gewinnung von Milzzellen	25
3.10 Färbung von Oberflächenmarkern und durchflusszytometrische Bestimmung der T-Zellen.....	26
3.11 Intrazelluläre Zytokinfärbung	27
3.12 Bestimmung der Zytokine im Serum	27

3.13 Messung Amylase und Lipase im Serum	28
3.14 Messung der MPO in der Lunge.....	29
3.15 Histologie der Lunge und des Pankreas	29
3.16 Software.....	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Aktivierung der zellulären Immunantwort im Verlauf der Pankreatitis...	31
4.2 Der Einfluss von IL-12p40 auf die Immunantwort im Verlauf der Pankreatitis	34
4.3 Der Einfluss von NLRP3 auf den Verlauf und die Immunantwort in der akuten Pankreatitis.....	36
4.4 Der Einfluss von IL-18 auf den Verlauf und die Immunantwort in der akuten Pankreatitis.....	38
4.5 Inhibition des Inflammasoms durch MCC950 und der Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis	42
5 Diskussion	46
5.1 Aktivierung des adaptiven Immunsystem.....	46
5.2 Mechanismus der Aktivierung von CD4+-T-Zellen.....	47
5.3 SIRS und CARS zwei getrennt ablaufende Ereignisse?	48
Literaturverzeichnis	51
6 Anhang	58
6.1 Zusammenfassung.....	58
6.2 Abkürzungsverzeichnis	59
6.3 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis.....	62
6.4 Lebenslauf	64
6.5 Eigene Publikationsliste	66
6.6 Erklärung zur Förderung des Projektes	69
6.7 Eidesstattliche Erklärung.....	70
Danksagung.....	71

1 Einleitung

1.1 Akute Pankreatitis

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Pankreas ist eine Drüse mit sowohl exokriner als auch endokriner Funktion. Der exokrine Teil des Pankreas ist für die Produktion und Sekretion von Verdauungsenzymen verantwortlich, auch Zymogene genannt ¹. Die meisten dieser Enzyme, vor allem die Proteasen, werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und sekretiert, wie z.B. Trypsinogen oder Pro-Elastase. Unter physiologischen Bedingungen werden die sekretierten Proteasen erst im Duodenum durch das Bürstensaumenzym Enterokinase aktiviert, um dort die Nahrung aufzuschließen. Dies stellt einen Schutzmechanismus des Organs vor seinen eigenen Enzymen dar. Um einer Aktivierung der pankreatischen Proteasen innerhalb des Pankreas vorzubeugen, werden ebenfalls Proteaseinhibitoren wie zum Beispiel der Serin Protease Inhibitor Kazal-Type 1 (SPINK-1) synthetisiert.

Die Entstehung der akuten Pankreatitis ist definiert durch einen akuten oder chronischen entzündlichen Prozess im Pankreas, der durch die vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen noch in den Azinuszellen selbst beginnt und letztendlich im Selbstverdau des Pankreas resultiert ². Dieser Selbstverdau führt zur Entstehung von Ödemen, Gefäßschädigung sowie dem nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang der Azinuszellen.

Die Pankreatitis gehört zu den führenden gastrointestinalen Erkrankungen in der Akutversorgung im Krankenhaus mit einer Inzidenz von 15-20/100000 Einwohnern pro Jahr ³. Dabei gibt es eine Geschlechterverteilung von 16/100000 Männer im Vergleich zu einer Inzidenz bei Frauen von 10,2 auf 100000 ⁴. In Langzeitstudien konnte gezeigt werden, dass in vielen europäischen Ländern die Häufigkeit der akuten Pankreatitis in den letzten 40 Jahren zugenommen hat ⁵.

Die Pankreatitis kann nach der Atlanta-Klassifikation in eine leichte akute, mittelschwere akute und schwere akute Pankreatitis eingeteilt werden ⁶. Während der Verlauf der Erkrankung bei etwa 80% mild verläuft, weisen 20% der Patienten schwere bis teilweise lebensbedrohliche Verläufe auf ⁷. Bei der milden, auch

ödematös genannt, Pankreatitis erfolgt eine Erholung innerhalb von 5 bis 7 Tagen, mit einer sehr geringen Mortalität ⁸. Im Falle einer schweren, nekrotisierenden, Pankreatitis liegt die Mortalität bereits bei 25 bis 30% ⁹. Die frühe Mortalität bereits in den ersten 2 Wochen ist meist Folge eines Multiorganversagens, wohingegen die späte Mortalität Folge septischer Komplikationen ist ¹⁰.

1.1.2 Ursachen

Es gibt eine Reihe möglicher Ursachen, die zu einer akuten Pankreatitis führen können. In Westeuropa sind Gallensteine und übermäßiger Alkoholkonsum der Grund für über 80% der akuten Pankreatitiden (Abbildung 1)¹. Neben diesen häufigen Ursachen gibt es auch viele weitere, die zur Entstehung einer Bauchspeicheldrüsenentzündung führen können; zum Beispiel: Medikamente wie Azathioprin, Statine oder Furosemid ¹¹, Infektionen mit verschiedenen Viren (Mumps-Virus) oder Parasiten, iatrogen durch eine endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP), hereditär (Mutationen im Trypsinogen-Gen), Autoimmunerkrankungen und rheumatologische Grunderkrankungen (Sjögren-Syndrom), Hypertriglyceridämie oder posttraumatisch (nach stumpfen Bauchtrauma) ¹². Bei etwa 10% der akuten Pankreatitiden kann bisher keine Ursache ermittelt werden (idiopathische Pankreatitis).

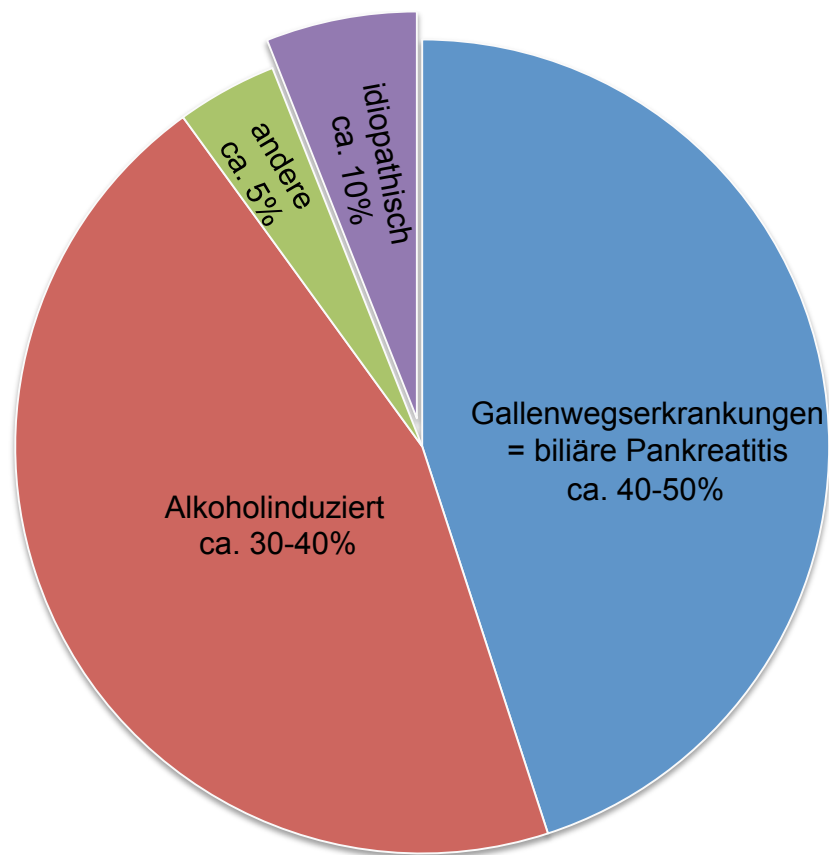


Abbildung 1: Ursachenverteilung für die Entstehung einer akuten Pankreatitis

1.1.3 Diagnostik und Klinik

Für die Diagnose einer Pankreatitis müssen zwei der drei folgenden Kriterien erfüllt sein. Zum einen klinische Beschwerden, des weiteren eine Erhöhung der Serumlipase über das dreifache der Norm und drittens typische morphologische Veränderungen in der Bildgebung ¹³. Heftige Oberbauchschmerzen sind das Leitsymptom der akuten Pankreatitis bei etwa 90% der Patienten. Diese können gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen. Die Schmerzintensität korreliert allerdings nicht mit dem Schweregrad der Bauchspeicheldrüsenentzündung. Weitere klinische Symptome können Erbrechen (80%), Gummibauch (60%), Darmparalyse (70%), Fieber (60%), Tachykardie (50%), Vigilanzstörung (10%) oder das Grey-Turner oder Cullen-Zeichen sein (1%) ⁹. Eine frühe Risikostratifizierung ist wichtig, da die

Prognose der akuten Pankreatitis wesentlich vom Verlauf in den ersten 24 Stunden abhängt. Für die Prognoseabschätzung werden verschiedenen Parameter genutzt. Diese fließen in Scoringssysteme ein, um eine Abschätzung des Schweregrades durchführen zu können.

Der Serumharnstoff ist ein wichtiger Parameter, da ein hoher Wert bei Aufnahme oder ein Anstieg in den ersten 24 Stunden mit einer erhöhten Mortalität korreliert ¹⁴. Weitere ungünstige Prognoseparameter sind eine Hypocalcämie ¹⁵ und ein erhöhter CRP über 150mg/l ¹⁶. Gegen einen schweren nekrotisierenden Verlauf sprechen ein normaler Hämatokrit und eine Normoglykämie ¹⁷. Eine Blutzuckerkonzentration von >125mg/dl (Normwert 60-100mg/dl) hat eine hohe Sensitivität für das Auftreten einer nekrotisierenden Pankreatitis.

Zur weiteren Abschätzung der Prognose sollten auch Patientenfaktoren einbezogen werden. Hierzu zählen das Alter, Komorbiditäten und Adipositas ¹⁸. Das Vorhandensein einer systemisch-entzündlichen Reaktion in Form eines "systemic inflammatory response syndromes" (SIRS) bei Aufnahme oder 48 Stunden nach Krankheitsbeginns kann ebenfalls Hinweis für einen schweren Verlauf sein ¹⁸. Zwei Scoringssysteme, die für die Prognoseabschätzung in der Klinik von Bedeutung sind, sind hier einmal aufgeführt: Atlanta Klassifikation ⁶ und "Bedside Index of Severity in Acute Pancreatitis" (BISAP) ¹⁹.

Atlanta Klassifikation:

Milde akute Pankreatitis

- Abwesenheit von Organfunktionsstörung
- Keine lokalen Komplikationen

Moderate akute Pankreatitis

- lokale Komplikationen und/ oder
- vorübergehende Organfunktionsstörung (< 48Stunden)

Schwere akute Pankreatitis

- persistierende Organfunktionsstörungen > 48 Stunden berechnet nach dem modifizierten Marshall-Score für Organfunktionsstörungen (Tabelle 1) (bei einem Score ≥ 2 liegt eine Organfunktionsstörung vor)

Tabelle 1: Marshall Score für Organfunktionsstörung adaptiert nach FGK_4-14_Hasselblatt_Web.pdf. ⁹

	Punkte				
Organsystem	0	1	2	3	4
(PaO ₂ /FiO ₂)	> 400	301 – 400	201 – 300	101 – 200	< 101
Serumkreatinin (mg/dl)	< 1,4	1,4 - 1,8	1,9 - 3,6	3,6 - 4,9	> 4,9
Kreislauf – RR (mmHg)	> 90	< 90	< 90	< 90	< 90
		Ansprechen auf Volumen	keine Ansprechen auf Volumen	pH <7,3	pH<7,2

“Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis“:

- **B:** Blutharnstoff
- **I:** “Impaired mental state“
- **S:** SIRS (2 der folgenden Kriterien erfüllt: Puls >90/min; Atemfrequenz >20/min oder pCO₂>32mmHg, Temperatur >38°C oder <36°C, Leukozyten >12g/l oder < 4g/l)
- **A:** Alter >60 Jahre
- **P:** Pleuraerguss (klassischerweise linksseitig)

Die Mortalität bei einem BISAP von 0 Punkten liegt bei weniger als 1%, wohingegen ein BISAP von 5 Punkten einer Mortalität von 22% entspricht.

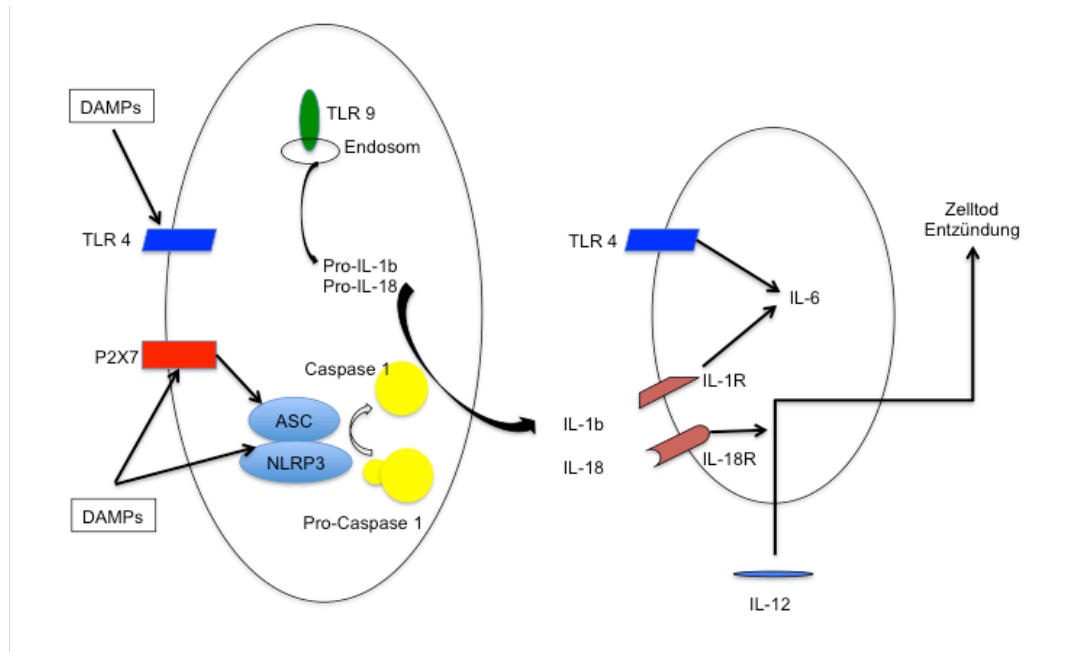
1.2 Rolle des Immunsystems in der akuten Pankreatitis

1.2.1 Die sterile Entzündung

Das erworbene Immunsystem besteht in erster Linie aus B- und T- Zellen, die durch hochspezifische Rezeptoren individuelle Moleküle erkennen und durch die Bindung der Moleküle wird eine Immunantwort induziert. Das Erkennen von körpereigenen Molekülen durch T- oder B-Zellen wird durch verschiedene Prozesse in der Ausdifferenzierung der Zellen verhindert (zentrale und periphere Toleranz) ²⁰.

Das angeborene Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Zellen; Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen und Mastzellen ²¹. Die Zellen erkennen Moleküle mit bestimmten Strukturelementen, welche nicht spezifisch nur bei einem Pathogen vorkommen und binden diesen über sogenannte "pattern recognition receptors" (PRRs) ²². Toll-like-receptors (TLRs) gehören zu den am besten untersuchten PRRs. Sie erkennen Moleküle wie das Lipolysaccharid (LPS), welches von gram-negativen Bakterien gebildet wird (Bindung an TLR4), doppelsträngige DNA (Bindung an TLR9) und einzelsträngige RNA (Bindung an TLR7) ²³. Es ist gezeigt worden, dass TLRs auch körpereigene Strukturen erkennen können, die sich im gesunden Organismus innerhalb der Zelle befinden und erst durch den Zelluntergang freigesetzt werden ²⁴. Zu diesen "damage associated molecular pattern molecules" (DAMPs) gehört unter anderem die mitochondriale DNA, die in der Lage ist den TLR9 zu aktivieren ²⁵, aber auch freie Histone oder freies ATP stellen DAMPs dar. Diese Form der Aktivierung des Immunsystems über PRRs, die sonst nur durch bakterielle oder andere infektiöse Stoffe ausgelöst wird, nennt man "sterile Entzündung" ²². Eine voll ausgebildete sterile Entzündung benötigt zwei Signale. Zum einen die Aktivierung des Rezeptor, welche die Expression proinflammatorischer (entzündungsfördernder) Zytokine induziert (z.B. pro-Interleukin-1beta oder pro-Interleukin 18. Das zweite Signal wird ausgelöst durch die Bindung der DAMPs an den P2X7-Rezeptor und den zytosolischen Rezeptor der "Nod-like-family" (NLR) ²⁶. Dadurch wird ein zytosolischer Komplex aktiviert, das Inflammasom, welche die proteolytische Spaltung der Caspase 1 reguliert. Die Caspase 1 ist ein Interleukin-Umwandlungs-Enzym (interleukin-converting enzyme

(ICE)), welche pro-IL1 beta und pro-IL18 in die aktive Form umwandelt ²⁷. Diese Erkenntnis der sterilen Entzündung spielt eine große Rolle für den Beginn der akuten Pankreatitis.



„Quelle: in Anlehnung an Hoque, R., Malik, A. F., Gorelick, F. & Mehal, W. Z. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas* **41**, 353–357 (2012).“

Abbildung 2: Aktivierung des Immunsystems bei einer sterilen Entzündung ²⁸

1.2.2 Zelltod in der akuten Pankreatitis

Der Schweregrad der akuten Pankreatitis korreliert mit dem Ausmaß der Zellschädigung und des Zelluntergangs ^{29,28}. Es sind verschiedene Formen des Zelluntergangs in der Literatur beschrieben, allerdings sind die in der akuten Pankreatitis am besten analysierten Wege des Zelltodes die Apoptose (kontrollierter Zelltod), die Nekrose (unkontrollierter Zelltod) sowie die Nekroptose (eine Form der induzierten Nekrose) ³⁰.

Die Nekrose/Nekroptose ist eine Selbstzerstörung der Zelle auf innere (z.B. die Freisetzung von Cathepsin B aus den Lysosomen in das Zytosol) ³¹ oder äußere Reize (wie z.B. die Induktion der Nekroptose über TNFα) ³². Die Autolyse kann

durch zelleigene Verdauungsenzyme ^{31,33}, wie z.B. Cathepsin B oder auch Trypsin eingeleitet werden ³⁴. Morphologisch zeigen sich eine Zellschwellung, eine Ruptur der Zellmembran und die Freisetzung des Zellinhalts. Bei der Nekrose werden Schaden-assoziierte Moleküle aus der Zelle freigesetzt, sogenannte “damage associated molecular pattern molecules “ (DAMPs), welche zu einer proinflammatorischen (entzündungsinduzierend) und das Immunsystem stimulierenden Reaktion führen. Eine große Anzahl an Publikationen konnte zeigen, dass die Nekrose/Necroptose die vorherrschende Form des Zelltodes der Azinuszellen im Verlauf der akuten Pankreatitis ist ^{35,36}. Währenddessen läuft die Apoptose hinsichtlich ihrer immunstimulatorischen Wirkung still ab, weil die Reste der untergehenden Zelle verpackt, mittels Phagozytose oder Autophagie entfernt ³⁷, und somit dem Immunsystem nicht präsentiert werden können. Allerdings zeigen Studien, dass es bei massiver Apoptose zu einer Freisetzung von nukleären DAMPs (nDAMPs) und mitochondrialen DAMPs (mitDAMPs) kommt, die dann auch in der Lage sind eine Entzündung und Immunantwort auszulösen ³⁸.

1.2.3 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem, auch unspezifisches Immunsystem genannt, zeichnet sich durch seine schnelle Reaktion auf z.B. eindringende Mikroorganismen aus ²¹. Viele dieser Mikroorganismen werden beim gesunden Menschen innerhalb weniger Minuten bis Stunden erkannt und zerstört. Diese früh induzierte Immunantwort unterscheidet sich von der erworbenen (adaptiven) Immunantwort nicht nur durch die Schnelligkeit, sondern auch dadurch, dass sich kein immunologisches Gedächtnis entwickelt ³⁹.

Es gibt viele verschiedene Komponenten des angeborenen Immunsystems. Sie beinhalten Erkennungsmoleküle, z.B. natürliche Antikörper, Pentraxine (z.B. C-reaktive Protein: CRP) und das Komplementsystem ⁴⁰. Die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems sind phagozytierende Zellen (z.B. Makrophagen), Antigen präsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen), und Killer-Zellen (z.B. Natürliche Killer-Zellen; NK-Zellen) ⁴¹. Ein weiterer Hauptbestandteil sind die

Epithelzellen. Sie fungieren als physikalische Barriere, Produzenten von Zytokinen und Chemokinen und können gefährliche Signale erkennen und verarbeiten.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen Mustererkennungsrezeptoren (sogenannte "pattern recognition receptors"; PRRs), die pathogenassoziierte Muster erkennen, die für Mikroorganismen typisch sind ⁴². Zu diesen membrangebundenen und auch zytosolischen Rezeptoren gehören die Toll like Rezeptoren (TLR). TLRs besitzen ein membrangebundenes Glykoprotein und haben charakteristische Ligand-Bindungs-Motive und Signal-Domänen ⁴³. Diese Signaldomänen kann man auch bei Zytokinen finden, z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-18 (IL-18). Die Rezeptoren der Interleukin 1 Familie als auch der Großteil der Toll-like Rezeptoren agieren über den MyD88/IRAK Signalweg, aus diesem Grund teilen sich diese Rezeptoren ähnliche Signalkaskaden, die zu einer Entzündung (Inflammation) führen können. Pattern recognition Rezeptoren induzieren 3 Hauptwege: Phagozytose, Inflammation und Ausreifung von Antigen präsentierenden Zellen, welche zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems führen ⁴⁴.

1.2.4 Das erworbene Immunsystem

Das Besondere bei der erworbenen Immunantwort ist, dass es sich um eine spezifische Antwort auf ein ganz bestimmtes Antigen handelt. Die Zellen dieses erworbenen Immunsystems sind Lymphozyten, die aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervorgehen und sich in unterschiedlichen Geweben entwickeln. Es gibt zwei zelluläre Hauptgruppen ⁴⁵. Die B-Zellen, welche sich im Knochenmark entwickeln, und die T-Zellen, die sich im Thymus entwickeln. Des Weiteren gibt es eine humorale Komponente (Immunglobuline, Ig), diese werden nach spezifischer Stimulation durch B-Zellen freigesetzt ⁴⁶.

Lymphozyten zirkulieren nach ihrer Reifung im Blut und gelangen so zu den lymphatischen Organen. Wenn die Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen auf ihr Antigen treffen, dass durch eine Antigen-präsentierende-Zelle (APC) dargeboten wird, kommt es zu einer spezifischen Immunreaktion. Jede T-Zelle reagiert hierbei spezifisch auf nur ein Antigen mit Proliferation und

Differenzierung ⁴⁷. Bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen kommt es zu einer schnelleren Immunantwort, da die Zellen des angeborenen Immunsystems sich zu Gedächtniszellen differenzieren können.

Die T-Lymphozyten können in CD8 positive und CD4 positive T-Zellen unterschieden werden. Die CD4-positiven T-Zellen, werden auch T-Helfer-Zellen (Th-Zellen genannt). Diese kann man nach ihrem Zytokinprofil in unterschiedliche Klassen einteilen. Th1-Zellen sind zum Beispiel gekennzeichnet durch die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon gamma (IFN- γ), wohingegen sich Th2-Zellen durch die Produktion von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) auszeichnen ⁴⁸.

1.2.5 NLRP3-Inflammasom

Die Entzündungsreaktion in der akuten Pankreatitis wird unterhalten durch die Schädigung der Azinuszellen und der daraus resultierenden intrapankreatischen Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin. Trypsinogen und die Trypsinogen aktivierende Protease Cathepsin B sind verantwortlich für den Zelltod der Azinuszelle und somit für die Gewebszerstörung ^{31,33}. Neuere Daten zeigen jedoch auch einen erheblichen Einfluss der Proteasen auf die Entzündungsreaktion und in der experimentell induzierten Pankreatitis ⁴⁹. Der Zelltod durch Nekrose unterhält die Zerstörung des Pankreasgewebes, führt zu einer Aktivierung von NF-kB und Expression des PYD Domäne enthaltenden Proteins 3 (NLRP3) –Inflammasom ⁵⁰. Das NLRP3-Inflammasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex aus NLRP3, dem Apoptose assoziierten Speck-ähnlichen Protein (ASC) und der Pro-Caspase 1. Die Entstehung des Inflammasoms kann durch Adenosintriphosphat (ATP), Nikotinamidadenindinukleotid (NAD), gesättigten freien Fettsäuren und durch Nekrose freigesetzte DAMPs induziert werden ⁵¹. Es ist verantwortlich für die proteolytische Prozessierung von pro-IL-1beta und pro-IL-18 zu ihren reifen Formen und induziert die Freisetzung von Effektoren; aktivem IL-1beta, IL-18 und dem “high-mobility-group protein B1” (HMGB1) ²². Der Inflammasome Komplex ist hauptsächlich in den Zellen des angeborenen Immunsystems, vornehmlich in Makrophagen, beschrieben. Nach der zytosolischen Aktivierung von pro-IL-1beta

und pro-IL-18 durchlaufen die Zellen den pyroptotischen Zelltod, welcher zur Freisetzung der reifen Zytokine IL-1 β und IL-18 führt. Diese Effektoren sind Hauptkomponenten in der Pankreasentzündung, beim Untergang des Pankreasparenchyms und für den Rückgang der akuten Pankreatitis⁵².

1.2.6 Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Interleukin-1 (IL-1)- Superfamilie. Es wird synthetisiert von dendritischen Zellen und Makrophagen. Da es in den Zellen eine große Menge von pro-IL-18 gibt, erfolgt die Regulation der Sekretion größtenteils durch die Aktivierung des Inflammasoms und weniger durch Expression⁵³. IL-18 induziert die Produktion vieler verschiedener Zytokine, z.B. Interferon-gamma (IFN- γ), IL-23 (IL-23), IL-4, IL-8, und GM-CSF. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von IFN-g in T-Zellen durch IL-18 nur möglich ist, in der Anwesenheit von IL-12⁵⁴. Ohne IL-12 führt die Aktivierung von IL-18 eher zu einer T-Zell-Antwort vom Typ Th2⁵⁵. IL-18 ist in der Lage NF- κ B zu aktivieren, die Expression des Fas-Liganden zu steigern und sowohl CC als auch CXC Chemokine zu induzieren⁵³. IL-18 konnte vermehrt im Serum von Patienten sowohl während der akuten als auch in der chronischen Pankreatitis gemessen werden^{35,56}.

1.2.7 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) ist ein starkes immunstimulatorisches Zytokin, das eine Brücke zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem bildet⁵⁷. Es besteht aus zwei Untereinheiten; IL-12p35 und IL-12p40. Nur die gemeinsame Expression beider Untereinheiten in einer Zelle führt zur aktiven Form, dem IL-12p70. Es induziert eine T-Helfer-Zell Antwort vom Typ 1 und die Expression von IFN-g sowohl in naiven als auch in Gedächtniszellen⁵⁸.

Die Untereinheit p40 ist ebenfalls eine Untereinheit für die aktive Form des Zytokins IL-23, welches aus den Untereinheiten p40 und p19 besteht. Interleukin-23 stimuliert die Proliferation von Gedächtniszellen allerdings nicht von naiven Zellen. Außerdem spielt IL-23 eine Rolle bei der Differenzierung von Th17-Zellen⁵⁹.

Studien haben gezeigt, dass IL-12p40 auch allein als Chemoattraktant auf Makrophagen wirkt und die Migration von bakteriell stimulierten dendritischen Zellen unterstützt ⁶⁰.

2 Zielsetzung

Die meisten Fälle der akuten Pankreatitis verlaufen relativ mild. Allerdings kommt es in etwa 20% der Fälle zu schweren Verläufen, welche mit erheblichen Komplikationen, wie z.B. Organversagen oder infizierten Nekrosen assoziiert sind. Diese schweren Verläufe gehen einher mit einer deutlich erhöhten Mortalität der Patienten. Die Aktivierung des Immunsystems z.B. durch DAMPs, freigesetzt aus nekrotischen Zellen, spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Neben den Zellen des angeborenen Immunsystems scheinen auch Zellen des erworbenen Immunsystems, CD4+-T-Zellen, einen Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis zu haben.

Das NLRP3 Inflammasom spielt durch seine Fähigkeit über sezernierte Interleukine Immunzellen zu stimulieren und Lymphozytenproliferation anzutreiben eine große Rolle in der Entstehung einer sterilen Entzündung bei vielen Erkrankungen. In dieser Arbeit soll geklärt werden welchen Einfluss sowohl die Bildung des Inflammasoms als auch die dadurch aktivierten Zytokine auf die Entstehung und den Verlauf der experimentellen Pankreatitis im Mausmodell haben. Es ist bekannt, dass durch die Schädigung des Pankreas, die Azinuszellen Mediatoren freisetzen, die vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems anlocken, Neutrophile und Makrophagen. Allerdings ist die Funktion des erworbenen Immunsystems noch unklar.

Zusammenfassend soll die Arbeit aufzeigen, welchen Einfluss CD4+-T-Zellen auf die Schweregrad und den Verlauf der akuten Pankreatitis haben und wie diese T-Zell Antwort reguliert wird.

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Cryo-Mikrotom	Leica, Wetzlar
CO ₂ -Inkubator Binder BF 240	Binder GmbH, Tuttlingen
Durchflusszytometer LSRII	Becton Dickinson, NJ, USA
Fluorometer	BMG Labtech
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Photometer	Molecular Devices
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck (Nadelhalter, Schere, Pinzette)	Aesculap, Tuttlingen
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	
Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
- Biofuge pico/fresco	
- Megafuge 1.0	
- Megafuge 16R	

3.2 Verbrauchsmaterialien

BD TruCOUNT™ Tubes	BD, Heidelberg
Chirurgisches Nahtmaterial	Catgut GmbH, Markneukirchen
Deckgläser	ROTH
End-to-End-Kapillaren (20 µL, K2E)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Falcontubes (15 mL, 50 mL)	BD, Heidelberg
Nuclon™ Surface 48-Well Plate	Thermo Scientific, MA, USA
Objektträger	Menzel-Gläser

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	
- 0,5 mL – Tuberculin Syringe 27G $\frac{1}{2}$	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
- 1mL–Micro-Fine™29G	BD Medical, Le Pont de Claix Cedex, Frankreich
Zellsieb	BD Falcon, Heidelberg
- 70 µm	

3.3 Reagenzien und Chemikalien

Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind bei den Methoden aufgeführt

ADG-Lyse	An der Grub Bio Research, Wien, Österreich
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
BD™ CompBeads	BD, Heidelberg
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Caerulein	Sigma-Aldrich, MO, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, MO, USA
Ethanol 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich, MO, USA
BD FACS™ Clean Solution	BD, Heidelberg
BD FACSTflow™ Sheath Fluid	BD, Heidelberg
BD FACS™ Rinse Solution	BD, Heidelberg

Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Uni-Apotheke
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, MO, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, MO, USA
Hexacetyltrimethylammoniumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	ThermoFisher Scientific, MA, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, MO, USA
o-Dianisidin	Sigma-Aldrich, MO, USA
PBS	Sigma-Aldrich, MO, USA
(PMSF)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Soyabean Trypsin Inhibitor (SBTI)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Tween 20™	Sigma-Aldrich, MO, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, MO, USA
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
VectaMount	VectorLaboratories Inc.

3.4 Kits

Amyl-Kit	Roch Hitachi
BD™ Cytometric Bead Array-Mouse Inflammation Cytokine Kit	BD, Heidelberg

Fix and Perm® Cell Permeabilization Kit ThermoFisher Scientific, MA, USA

Foxp3 Staining Buffer Set Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Lip-Kit Roch Hitachi

3.5 Puffer, Medien und Lösungen

Injektionslösung Ketamin/Xylazin

0,5 mL Rompun® (2 % Injektionslösung, Xylazin (als Xylazinhydrochlorid))

4,0 mL Ketanest® (25 mg/mL Injektionslösung, Esketaminhydrochloridlösung)

5,5 mL isotone Natriumchlorid- Lösung 0,9 %

Dosierung: 10 µL pro g KG (entspricht 100 mg/10 mg pro kg KG) Lagerung bei 4 °C

Erythrozytenlysepuffer

0,01 M KHCO₃

0,155 M NH₄Cl

0,1 mM EDTA

Lagerung bei Raumtemperatur

FACS-Puffer

2 mM EDTA

2 % FCS

0,02 % NaN₃

BD FACSTFlow™ Sheath Fluid

Lagerung bei 4 °C

MPO-Homogenisierungspuffer

20mM KH₂PO₄

pH 7,4 mit KOH eingestellt

Lagerung bei Raumtemperatur

MPO-Meßpuffer

50mM KH₂PO₄

pH6,0 mit KOH eingestellt

Lagerung bei Raumtemperatur

MPO-Extraktionspuffer

100ml Meßpuffer + 186mg EDTA

7,5ml Extraktionspuffer

+0,5 ml SBTI

+1ml PMSF

+1ml Hexacetyltrimethylammoniumbromid (5%)

immer frisch angesetzt

3.6 Software und Datenbanken

FACS Diva Software v6.2	BD Biosciences, CA, USA
FCAP Array TM v1.01 und 3	Soft Flow, Pécs, Ungarn
FlowJo 7.6.1	Tree Star Inc., OR, USA
GraphPad Prism 5.0.1	GraphPad Software Inc., CA, USA
Office (Word, Exel)	Microsoft
Optima (Auswertung der fluoro- metrischen Daten)	BMG Labtech
Sigma Plot	Systat Software
Soft MaxPro (Auswertung der photometrischen Daten)	Molecular Devices
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

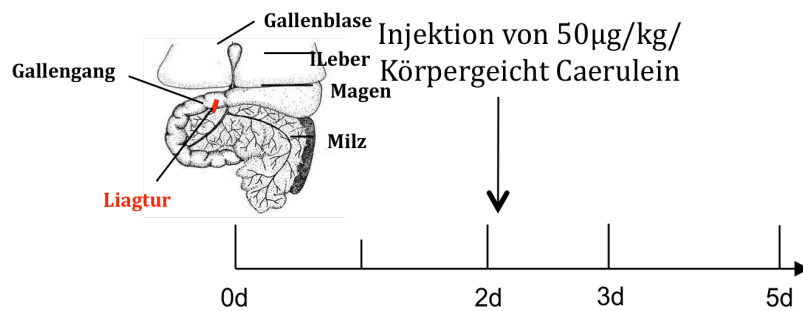
3.7 Mäusstämme

Für die Untersuchung der immunmodulatorischen Mechanismen in der akuten Pankreatitis wurden verschiedene Mäusstämme genutzt. Zum einen C57BL/6 Mäuse, die von Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen wurden. Die C57BL/6-Mäuse dienten in dieser Arbeit als Kontrolltiere mit kompetenten Immunsystem.

Des Weiteren wurden NLRP3 knockout (B6.129S6-*Nlrp3*^{tm1Bhk}/J), IL-18 (B6.129P2-*Il18*^{tm1Aki}/J) knockout und IL-12p40 (B6.129S1-*Il12b*^{tm1Jm}/J) knockout Mäuse genutzt, die über JaxMice (Bar Harbor, ME, USA) bezogen wurden. Diese Tiere wurden in dieser Arbeit genutzt, um verschiedene Wege, die zur Entstehung oder zum Aufrechterhalten einer Immunreaktion führen könnten, auszuschalten. Die Haltung erfolgte in konventionellen Tierräumen der Universität Greifswald unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus und Zugang zu Wasser ad libitum gehalten.

3.8 Induktion der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis wurde mittels einer partiellen Gangligatur induziert. Die Ligatur des Pankreasganges oberhalb der Mündung des Gallenganges in den Pankreasgang führt zu einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis in dem ligierten Teil des Pankreas, der nicht von der Ligatur betroffene Teil des Organs bleibt dabei intakt. Unter Vollnarkose wurde bei den Tieren eine Pankreasgangligatur durchgeführt. Die Vollnarkose für die Operation wird durch die Kombination von Ketamin Hydrochlorid (100 mg/kg i.p.) und Xylazin Hydrochlorid (2.5-5 mg/kg i.p.) herbeigeführt. Das Abdomen wird mit einer 1 cm breiten Laparotomie eröffnet, anschließend wird der Kopf des Pankreas identifiziert und mit Hilfe eines Wattestäbchens freigelegt. Der Pankreasgang wird oberhalb der Einmündung des Gallenganges mittels eines chirurgischen Fadens (4/0 DS19, nicht resorbierbarer PVDF Faden) ligiert. Das Abdomen wird mit einer zweischichtigen Naht (Polyester) verschlossen. Zwei Tage nach dem operativen Eingriff werden die Tiere einmalig durch eine i.p. Injektion von Caerulein (50 µg Caerulein/kg/Körpergewicht) stimuliert.



„Quelle: Sendler M, **van den Brandt C**, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, Homuth G, De Freitas Chama LL, Mishra N, Mahajan UM, Bossaller L, Völker U, Bröker BM, Mayerle J, Lerch MM. *NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Responses in Mice With Acute Pancreatitis*. Gastroenterology. 2019 Oct 5. pii: S0016-5085(19)41413-3“

Abbildung 3: Behandlungsschema zur Induktion der akuten Pankreatitis in den Versuchstieren ⁶¹

3.9 Gewinnung von Milzzellen

Die Milzen der C57BL/6 Mäuse wurden isoliert und jeweils in 5ml eiskaltem PBS aufgenommen. Die Organe wurden anschließend durch ein 70µm Nylonsieb gerieben, mittels einer Pipette resuspendiert und erneut durch ein Nylonsieb gefiltert. Danach wurde die Zellsuspension bei 1500rpm abzentrifugiert. Da Erythrozyten ein großer Bestandteil der Milz sind und sowohl bei der Bestimmung der absoluten Zellzahl als auch bei der Ausführung durchflusszytometrischer Analysen stören, erfolgte eine Erythrozytenlyse mit 0,16M Ammoniumchlorid. Für die Lyse wurde das nach Zentrifugation entstandene Pellet in 1ml Ammoniumchlorid resuspendiert und für 3 Min. inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 5ml PBS dazugegeben, und die Zellen bei 1200rpm erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels BD TrueCount™ Verfahren bestimmt. Hierbei wurden die gleichnamigen Analyseröhrchen genutzt, die eine definierte Anzahl von beads enthalten, fluoreszierende Partikel, die im Durchflusszytometer detektiert werden können. Es wurden 20µl der Zellsuspension auf 200µl der Beads gegeben und dann im FACS gemessen. Die Berechnung erfolgte anhand der unten stehenden Gleichung:

$$\frac{\text{Events in Ziel-Region}}{\text{Events in Bead-Region}} \times \frac{\text{Gesamtzahl der Beads im Tube}}{\text{Probenvolumen (}\mu\text{l)}} = \text{absolute Zellzahl pro } \mu\text{l}$$

3.10 Färbung von Oberflächenmarkern und durchflusszytometrische

Bestimmung der T-Zellen

Die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA kann mittels Durchflusszytometrie (FACS) erfolgen. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Für unseren Versuch wurde das BD™ LSRII Durchflusszytometer genutzt. In der Tabelle 1 werden die genutzten Laser und Fluorochrome aufgeführt.

Tabelle 2: Fluorochrome und Antigene

Fluorochrom	Laser	Filter	Antigen
Brilliant Violet 421	405nm	450/50	Ly-6G, T-bet, IL-17a
Brilliant Violet 510		525/50	CD19, IFN γ , CD69
Brilliant Violet 605		610/50	T-bet
Brilliant Violet 650		670/50	IFN γ
FITC	488nm	525/50	CD3e, CD25, CD4
Per-CP		710/50	CD3
PerCP-Cy5.5		710/50	CD3e
PE	561nm	582/15	CD4, CD69, GATA3, IL-10
PE/Dazzle		610/20	IL-4
PE-Cy5.5		710/50	CD4
PE-Cy7		780/60	F4/80, TNF α , CD25
APC	640	670/14	IL-2, FoxP3, CD62L
A647		670/14	CD19
APC-A780		780/60	Zombie-NIR
APC-Cy7		780/60	CD11b

3.11 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für diese Methode wurden die isolierten Einzellsuspensionen aus der Milz mit PMA/Ionomycin für 4 h bei 37°C restimuliert. Damit die Zytokine, die durch die Restimulation gebildet werden nicht aus der Zelle ausgeschleust werden, wurde Brefeldin A verwendet, dass den intrazellulären Transport blockiert und so eine Akkumulation der meisten Zytokine im rauen endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Komplex stattfindet. Nach 4 Stunden wurden die Zellen geerntet und in für die FACS-Analyse entsprechende Röhrchen überführt. Um nicht-spezifische Färbungen zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Blockierung von Immunglobulin-Rezeptoren (Fc-Rezeptoren) durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker CD3 und CD4. Die Zellen wurden gewaschen, zentrifugiert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Nach Permeabilisierung erfolgte die Färbung für die unterschiedlichen Zytokine und Transkriptionsfaktoren. Für die Th1-Antwort wurden TNF α , IFN γ und der Transkriptionsfaktor T-bet; und für die Th2-Antwort IL-4, IL-10 und der Transkriptionsfaktor GATA-3 untersucht. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend im FACS ausgewertet.

3.12 Bestimmung der Zytokine im Serum

Zur Bestimmung verschiedener Zytokinkonzentrationen im Serum wurden das BDTM Cytometric Bead Array – Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (IL-6, IL-10, IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF, IL17-A, #560485, BD, Heidelberg) oder das BDTM Cytometric Bead Array – Mouse Inflammation Cytokine Kit (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , IL-12p70, TNF, #552364, BD, Heidelberg) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Der Cytometric Bead Array ist eine Methode zum quantitativen Nachweis löslicher Zytokine mittels Durchflusszytometrie. Es handelt sich dabei um einen partikelbasierten Test, der in einer Probe mehrere Proteine gleichzeitig misst (Multiplexing). Mehrere distinkte Partikelpopulationen werden vom Hersteller mit einem Fluorochrom so markiert, dass die Populationen anhand der „Fluoreszenzhelligkeit“ unterschieden werden können. Jede einzelne Partikelpopulation ist zusätzlich mit Antikörpern, deren Bindungsstelle gegen das

nachzuweisende Protein gerichtet ist, beschichtet. Nach Bindung der zu messenden Proteine erfolgt die Markierung mit Fluorochrom markierten Detektionsantikörpern, die an das bereits partikelgebundene Protein binden.

So erfolgt eine zweidimensionale Auftrennung des Partikelgemischs. Auf Achse 1 finden sich die distinkten Partikelpopulationen. Damit wird die Unterscheidung zwischen den nachzuweisenden Proteinen möglich. Auf der Achse 2 erfolgt die Auftrennung nach Menge des gebundenen Sekundärantikörpers und damit nach Menge des Proteins im Analysat. Eine kalibrierende Verdünnungsreihe mit Proteinstandards ermöglicht die Quantifizierung des Ergebnisses.

Zunächst wurde der lyophilisierte Mouse Inflammation Standard vorsichtig mit der Pipette in 2 mL Assay Diluent für 15 Minuten bei Raumtemperatur rekonstituiert. Anschließend wurde eine achsstufige 1:2 Verdünnungsreihe in Assay Diluent vorgenommen. Die Serumproben (Lagerung bei -80 °C) wurden auf Eis aufgetaut. 20 µL Probe bzw. Standard wurden anschließend mit 20 µL Bead-Mix (sechs bzw. sieben verschiedene Beadpopulationen) und 20 µL PE-Reagenz für drei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 200 µL Waschpuffer (250 g, vier Minuten) wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgenommen und die Proben in 200 µL Waschpuffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am LSR II. Die Auswertung wurde mit der FCAP Array™ Software (v1.01 und 3) vorgenommen.

3.13 Messung Amylase und Lipase im Serum

Die Bestimmung der Serum Amylase sowie der Serum Lipase erfolgte durch ein Kit der Firma Roche-Hitachi. Die Messung erfolgte laut Angaben des Herstellers. Das Serum wurde 1:20 mit PBS verdünnt und je 10 µl Serum dieser Verdünnung mit 90 µl des jeweiligen Substrates versetzt. Die Aktivitätsmessung erfolge als 3-fach Bestimmung gegen einen Standard mit Hilfe des Photometers bei 37°C. Die Aktivitäten wurden als Kinetik über 30 min gemessen (für Amylase bei einer Wellenlänge von 405nm und für die Lipase bei einer Wellenlänge von 570nm). Die Auswertung erfolgte in dem Messbereich in dem die Proben einen linearen Anstieg zeigten.

3.14 Messung der MPO in der Lunge

Für die Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität wurde das bei -80°C eingelagerte Lungengewebe mit 500 μl Homogenisationspuffer versetzt und anschließend mit Hilfe eines Douncers homogenisiert. Die Proben wurden bei 4°C für 10 min bei 10000rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 μl Extraktionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Im weiteren Verlauf wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 4 Mal wiederholt. Die Resuspension der wieder aufgetauten Proben erfolgte mit Pipettenspitzen mit absteigendem Durchmesser. Zum Abschluss wurden die Proben 2x mit der Ultraschallsonde behandelt und wiederum bei 4°C und 10.000rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität bei -80°C aufbewahrt.

Die Messung der Myeloperoxidase erfolgte photometrisch. Es wurde eine Kinetik bei einer Wellenlänge von 460nm und 30°C über 10 min erstellt. Als Substrat diente ein Messpuffer der mit o-Dianisidin (0,53 mM) und Wasserstoffperoxid (0,15 mM) versetzt wurde. Das Lungenhomogenat wurde für die Messung 1:5 verdünnt und davon wurden 10 μl jeweils mit 90 μl des Substrates versetzt. Die Analyse der MPO erfolgte als Dreifachbestimmungen. Als Standard diente aufgereinigte Myeloperoxidase. Für die Auswertung der Messung wurde der lineare Anstieg der Enzymaktivität gewählt.

3.15 Histologie der Lunge und des Pankreas

Es wurden von Pankreas als auch von Lunge, Leber und Milz 1-2 μm dicke Paraffin Schnitte angefertigt und dann mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

1. Entparaffinieren

2 x 10 Minuten Xylol

2 x 5 Minuten 100% Ethanol

2 x 5 Min. 96% Ethanol

2 x 5 Min. 70% Ethanol in A. dest. spülen

2. Färben

5 Minuten Hämalun

2 Minuten unter fließendem Leitungswasser wässern in A. dest. spülen

2 Minuten Eosin

3. Entwässern

30 Sek. in 70% Ethanol

30 Sek. in 96% Ethanol

30 Sek. in 100% Ethanol

10 Min. Xylol

Danach wurden die Präparate mit VectaMount eingedeckt und anschließend im Durchlichtmikroskop ausgewertet und fotografiert.

3.16 Software

Für die Analyse der durchflusszytometrischen Daten wurde FlowJo (FlowJo LLC Ashland, Oregon, USA) genutzt. Die statistische Auswertung und Generierung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) und SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, Erkrath, Deutschland).

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung der zellulären Immunantwort im Verlauf der Pankreatitis

Die akute Pankreatitis wurde durch Ligatur des Ganges und zusätzliche Applikation von Caerulein (siehe Abbildung 3) induziert. Während einer Pankreatitis kommt es durch den Untergang von Azinuszellen zu einer Freisetzung von Amylase, dadurch steigt auch im Serum die Amylasekonzentration an. Aus diesem Grund dient der Serum-Amylase Spiegel auch als Schadensmarker für den Schweregrad der Pankreatitis. In den analysierten Serumproben der behandelten Wildtyptiere zeigte sich sowohl an Tag 2, als auch an Tag 3 ein Anstieg der Amylase im Serum, welcher an Tag 5 wieder annähernd das Grundniveau erreicht hat.

Da es während der Pankreatitis auch zu einer systemischen Reaktion kommt, wurde die Konzentration der Myeloperoxidase in der Lunge gemessen. Die Myeloperoxidase ist ein Enzym das in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und somit einen Hinweis über die Einwanderung von Zellen des angeborenen Immunsystems in das jeweilige Organ gibt. Bei der Messung der Myeloperoxidase Aktivität im Lungenhomogenat zeigte sich ein Anstieg an allen untersuchten Tagen nach Induktion des Pankreasschadens in den Wildtyptieren.

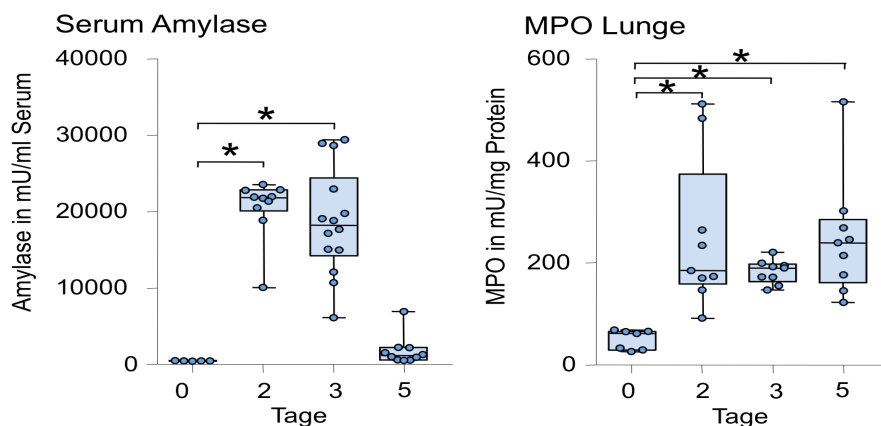


Abbildung 4: Bestimmung der Serum-Amylase und der MPO in der Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten in der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen.

Zur Bestimmung des lokalen Schadens im Verlauf der akuten Pankreatitis wurde das entnommene Pankreas- und Lungengewebe im Verlauf der Pankreatitis beurteilt. Es wurde dabei die Ausbildung von Nekrosen, Leukozyteninfiltraten und Vakuolenbildung bewertet. Es zeigte sich sowohl im Pankreas- als auch im Lungengewebe ein deutlicher Zelluntergang und eine Infiltration von Leukozyten ins Gewebe, der über die Zeit zunahm.

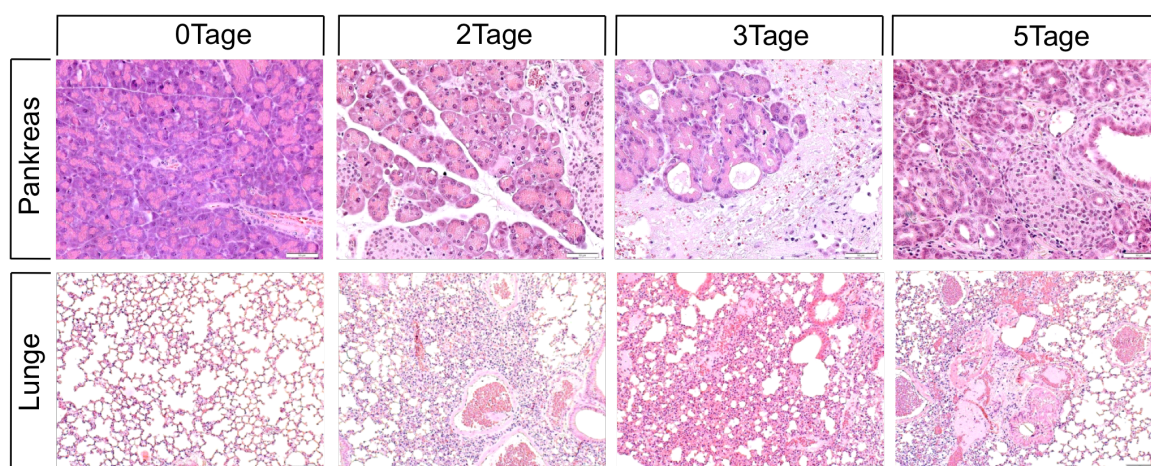


Abbildung 5: Histologie des Pankreas und der Lunge im Verlauf der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen.

Im Zuge der lokalen Immunantwort und der Infiltration von Immunzellen in das geschädigte Organ sollte überprüft werden ob es zu einer Aktivierung von T-Zellen kommt. Aus diesen Grund wurden T-Zellen aus der Milz bis zu 5 Tagen nach Induktion der Pankreatitis auf ihren Aktivierungsstatus hin untersucht. Es zeigte sich sowohl eine Erhöhung der frühen Aktivierungsmarker, CD69, als auch der späten Aktivierungsmarker, CD25, über die Zeit. Der höchste Aktivierungsgrad konnte an Tag 3 nach Induktion der Pankreatitis verzeichnet werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen in den verschiedenen Mausmodellen dieser Zeitpunkt als Endpunkt gewählt.

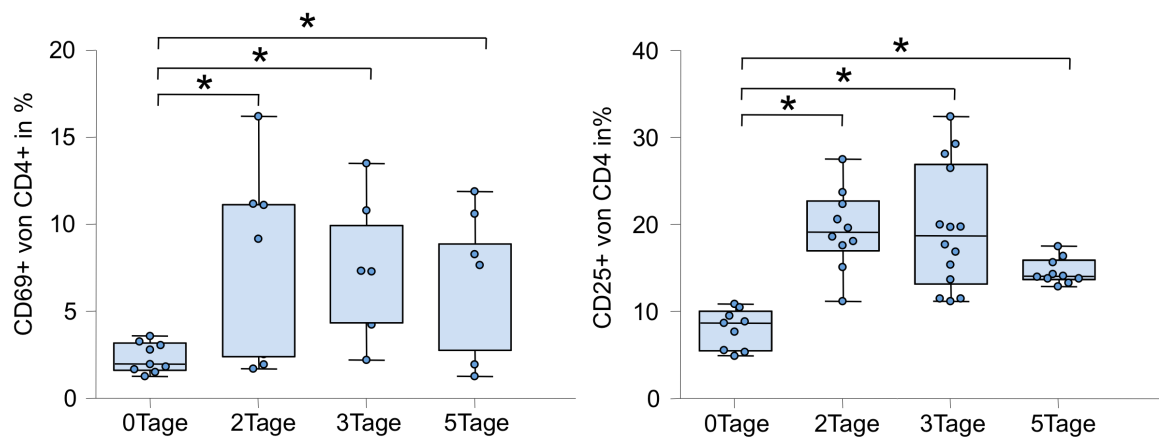


Abbildung 6: T-Zell-Aktivierung nach Induktion der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen

Um eine funktionelle Aussage über die T-Helfer-Zellen treffen zu können, wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 eine Th2-Antwort dominiert. Zum einen sah man einen signifikanten Anstieg des Transkriptionsfaktors GATA-3 als auch einen signifikanten Anstieg der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10, wohingegen Th1-spezifische Transkriptionsfaktoren und Zytokine keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zeigten.

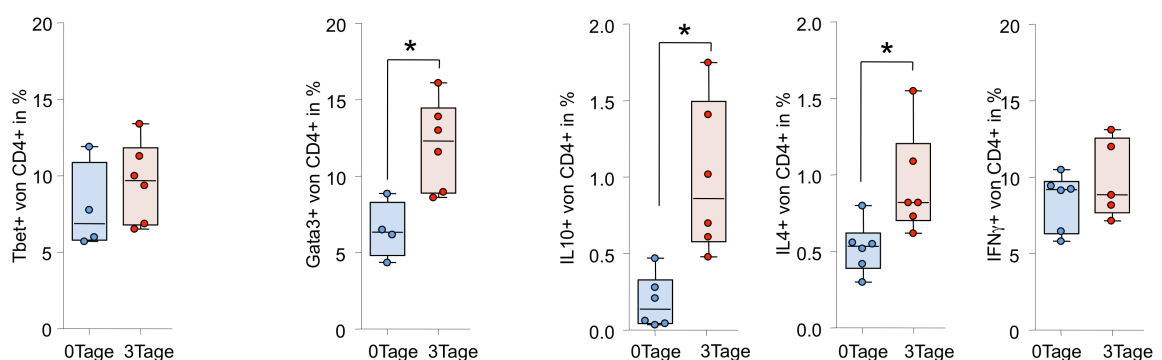


Abbildung 7: Intrazelluläre Messung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren der T-Zellen im Verlauf der akuten Pankreatitis in der Maus

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion der Pankreatitis in Wildtyptieren zu einer Aktivierung von T-Zellen in der Milz, einer systemischen Inflammation mit Infiltration von Leukozyten in die Lunge und zu einer erhöhten Th-2-Antwort führt.

4.2 Der Einfluss von IL-12p40 auf die Immunantwort im Verlauf der Pankreatitis

Nach Induktion der Pankreatitis in IL-12p40^{-/-} Mäusen erfolgte die Messung der Schadensmarker, Amylase und Lipase, im Serum. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied an Tag 3 zwischen der Kontrollgruppe und den Knockout Mäusen.

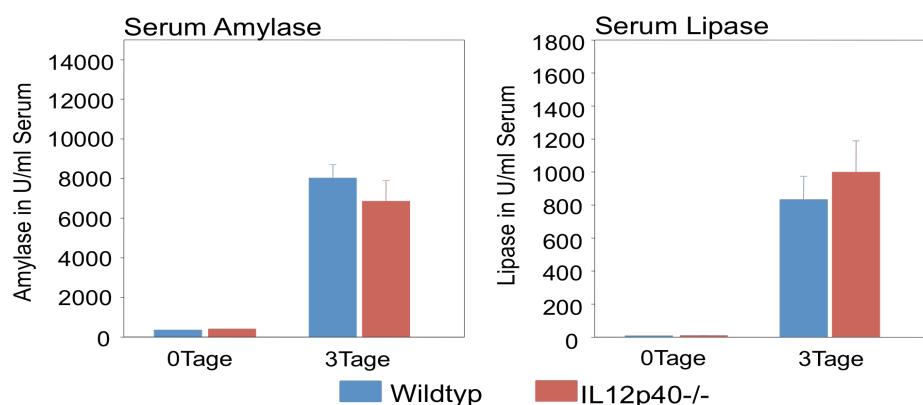


Abbildung 8: Bestimmung der Serum-Amylase und Serum-Lipase in der akuten Pankreatitis in IL-12p40^{-/-} Mäusen

Auch in der histologischen Untersuchung des Pankreas konnte kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Leukozyteninfiltration, die Vakuolisierung und der Nekrosebildung zwischen den Wildtyp- und knockout-Mäusen gezeigt werden (Abbildung 9).

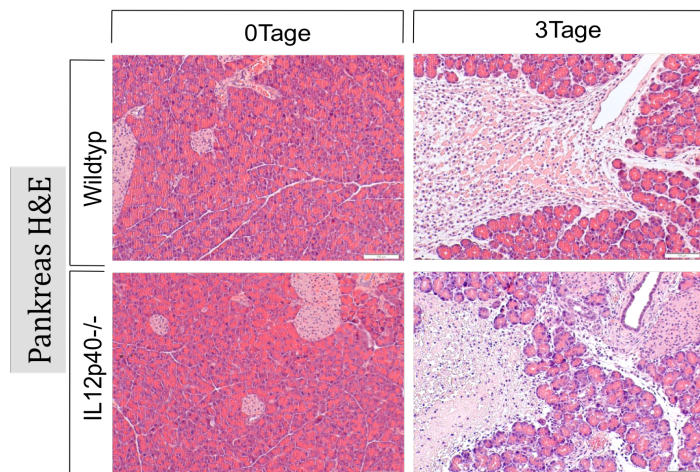


Abbildung 9: Histologische Untersuchung des Pankreas 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in Wildtyp- und IL-12p40^{-/-} Mäusen.

Im weiteren Verlauf wurde das Schadensbild in der Lunge sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den IL-12p40^{-/-} Mäusen analysiert. Es zeigten sich im histologischen Bild und auch bei der Messung der MPO keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 10)

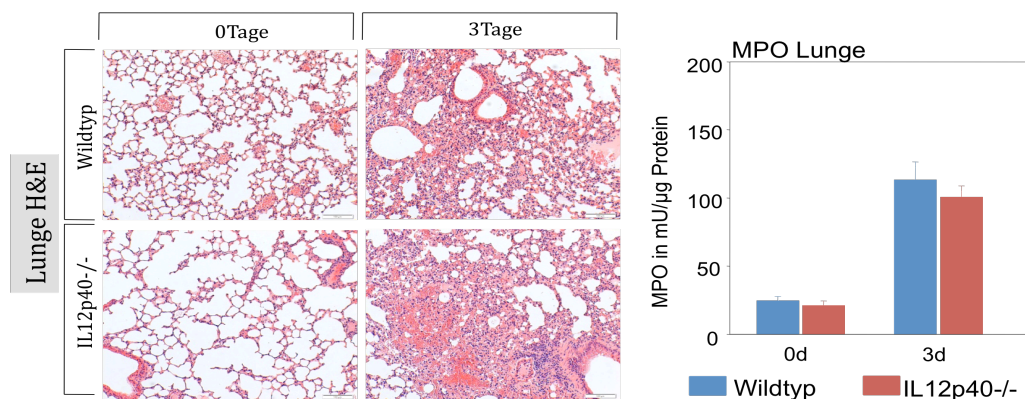


Abbildung 10: Histologie der Lunge und Messung der MPO in der Lunge 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis

Um den Einfluß von IL-12p40 auf die adaptive Immunantwort zu untersuchen, erfolgte die Analyse der T-Zellen in Hinblick auf ihre Aktivierungsmarker. 3 Tage

nach Induktion der Pankreatitis konnte eine Aktivierung der T-Zellen gemessen werden. Diese zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildttypen und den IL-12p40^{-/-} Mäusen (Abbildung 11).

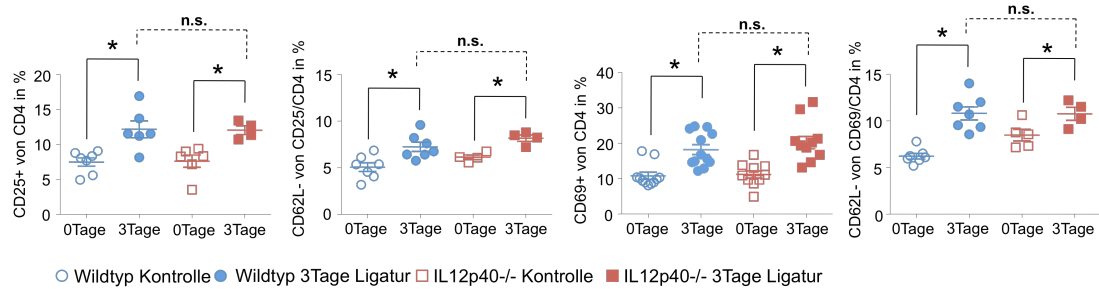


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Bestimmung der Aktivierungsmarker 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in Wildtyp- und IL-12p40^{-/-} Mäusen

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass das Fehlen von IL-12p40 keinen Einfluss auf die Aktivierung der T-Zellen sowie den Schaden im Verlauf der akuten Pankreatitis hat.

4.3 Der Einfluss von NLRP3 auf den Verlauf und die Immunantwort in der akuten Pankreatitis

Um den Einfluss der Bildung des NLRP3-Inflammasoms auf den Verlauf der akuten Pankreatitis zu untersuchen, erfolgte die Induktion der Pankreatitis in NLRP3-knockout Mäusen. Hier zeigte sich 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis ein signifikant geringerer Schaden im Vergleich zu Kontrollgruppe gemessen an der Amylase im Serum. Des Weiteren zeigte sich in der histologischen Übersichtsfärbung der Pankreata deutlich weniger Vakuolisierungen und Nekroseareale in knockout Mäusen im Vergleich zu den dazugehörigen Wildtptieren (Abbildung 12).

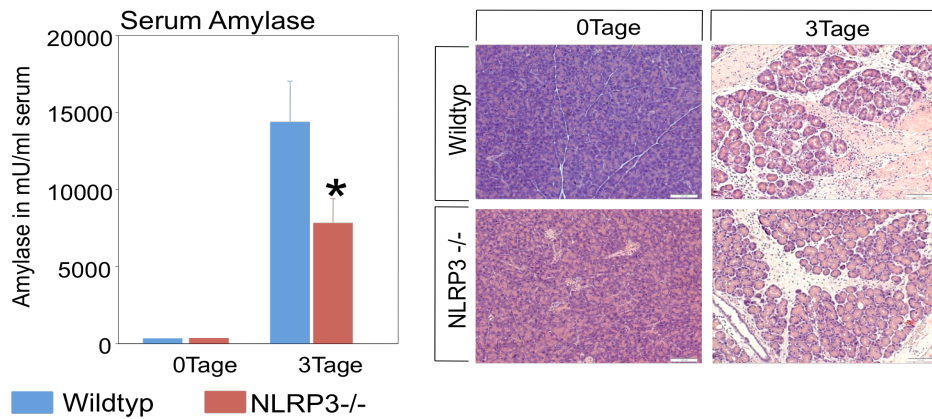


Abbildung 12: Messung der Amylase im Serum und histologische Untersuchung der Pankreata mittel H&E Färbung 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP3 knockout- und Wildtypmäusen

Die Untersuchung des systemischen Schadens zeigte in der Lunge eine geringere Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe und auch eine signifikant geringere MPO-Aktivität im Lungenhomogenat in den NLRP3-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

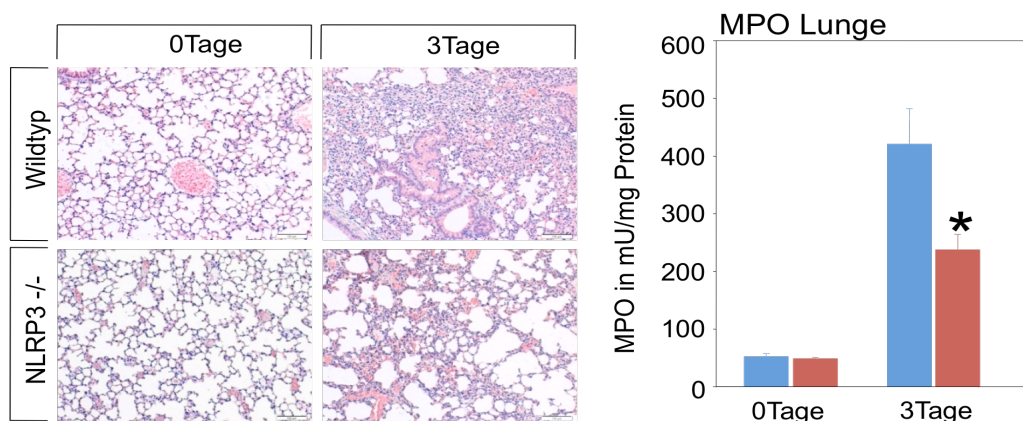


Abbildung 13: histologische Untersuchung des Lungengewebes mittels H&E-Färbung und Messung der MPO in Lungenhomogenat 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP-3- knockout- und Wildtypmäusen

Im nächsten Schritt wurde die adaptive Immunantwort untersucht. Hierfür erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der T-Zellen in der Milz. Es zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 in den Knockout-Mäusen im Vergleich von Tag 0 und Tag 3 nach Induktion der Pankreatitis. Wohingegen es zu einer deutlichen Aktivierung der T-Zellen in den Wildtyptieren 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis kam (Abbildung 14).

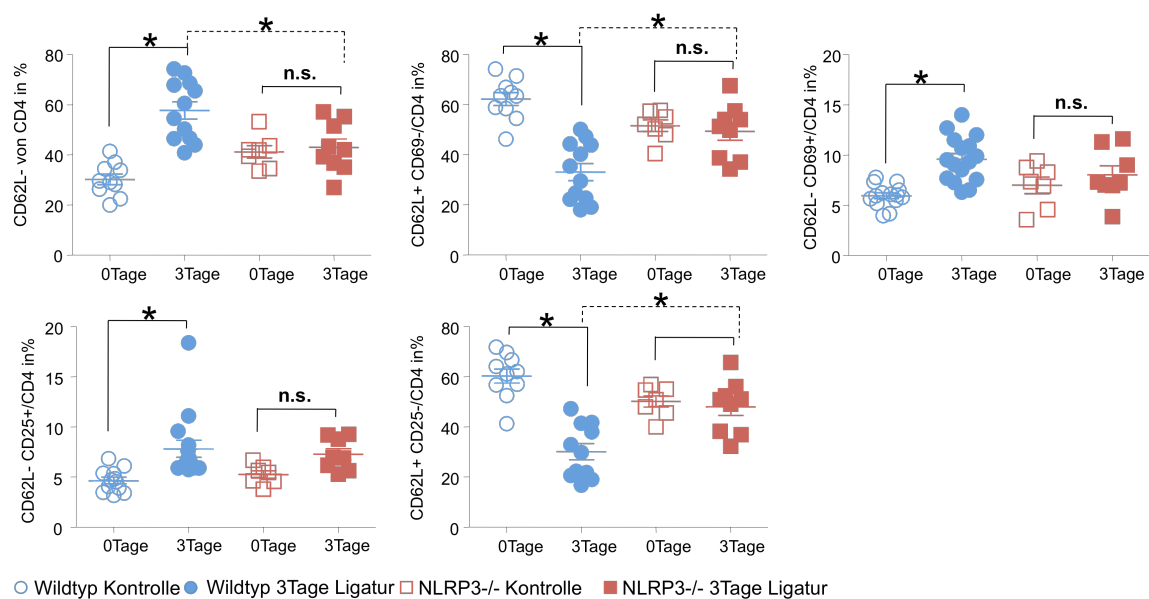


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der oberflächlichen Aktivierungsmarker CD69, CD25 und CD62L auf T-Zellen der Milz 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP3- knockout- und Wildtyp-Mäusen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Verhinderung der Bildung des NLRP3-Inflammasoms zu einem geringeren systemischen Schaden im Verlauf der Pankreatitis und zu einer fehlenden T-Zell-Aktivierung kommt.

4.4 Der Einfluss von IL-18 auf den Verlauf und die Immunantwort in der akuten Pankreatitis

In den folgenden Experimenten soll der Einfluß des Inflammasoms auf die Induktion der T-Zell Antwort untersucht werden. IL-18 ist ein Hauptprodukt des

Inflammsoms, welches in Abwesenheit von IL-12 die Th2-Antwort fördert, wie wir sie in Wildtyp Tieren zeigen konnten. Dies legt die Vermutung nahe, dass IL-18 einen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung/Differenzierung hat. Aus diesem Grund wurden in IL-18 knockout Mäuse verwendet. Nach Induktion der Pankreatitis zeigte sich ein signifikant geringerer Schaden, gemessen an den Schadensparametern Amylase und Lipase, in den knockout Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abbildung 15).

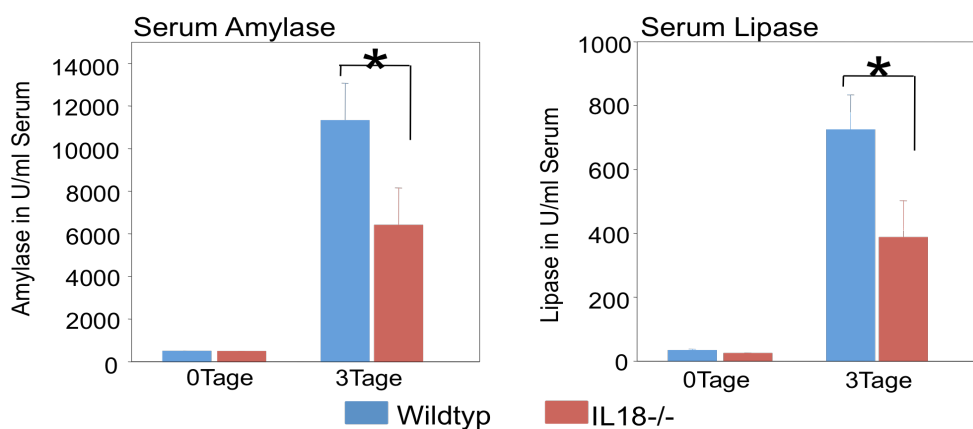


Abbildung 15: Bestimmung der Serum-Amylase und Serum-Lipase in der akuten Pankreatitis in IL18-/- -Mäusen

Der geringere Schaden nach Induktion der Pankreatitis in den IL-18-/- Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnte auch in der histologischen Analyse der Pankreata bestätigt werden (Abbildung 16).

Im nächsten Schritt erfolgte die Analyse der T-Zell Antwort in der Milz mittels Durchflusszytometrie. Die Aktivierung der T-Zellen war signifikant niedriger in den IL-18 knockout Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Dies konnte durch die Messung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Der Oberflächenligand CD62L diente als zusätzliches Kriterium für den Aktivierungszustand der T-Zellen, da dieser bei Aktivierung nicht mehr auf der Oberfläche der T-Zellen nachweisbar ist.

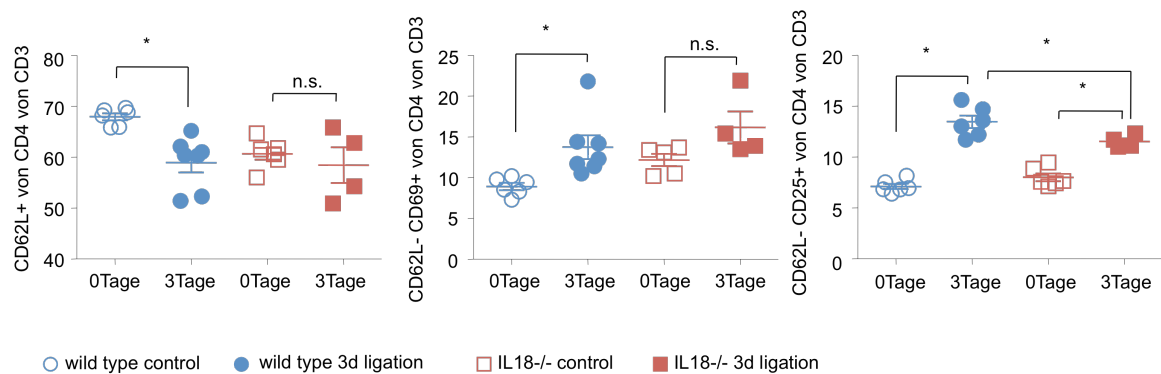


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Bestimmung der Aktivierungsmarker auf T-Zellen 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis

Um den Einfluss von IL-18 auf die Induktion der Th-2 Antwort in unserem Modell zu untersuchen, wurde die Expression von Gata3 in CD4+-Zellen gemessen. Für die Messung der Th-1 Antwort diente die Expressionskontrolle von T-bet in den CD4+-Zellen. Es zeigte sich, dass es im Verlauf der akuten Pankreatitis zu keiner Induktion der Th-2 Antwort in den IL-18 knockout Tieren kam, ganz im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die einen signifikanten Anstieg an GATA3+ CD4+-Zellen zeigten (Abbildung 19).

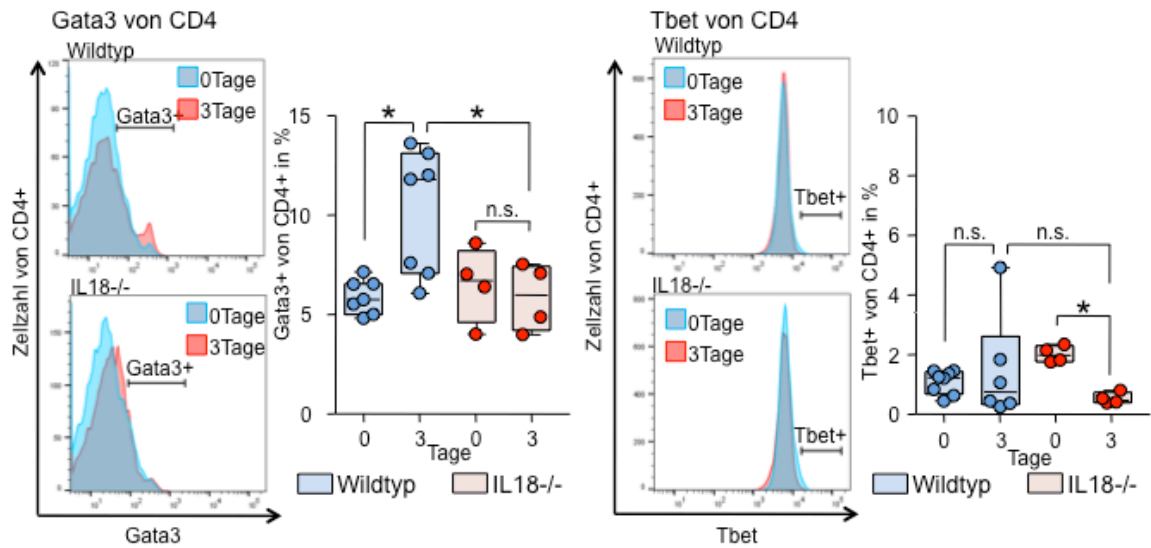


Abbildung 19: Messung der Th1- und Th2-Antwort durch intrazelluläre Färbung der spezifischen Marker Gata3 (Th2) und Tbet (Th1) 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in IL-18-/- Mäusen und Wildtypmäusen

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die durch das NLRP-3 Inflammasom induzierte Ausschüttung von IL-18 einen Einfluss auf die Ausbildung einer Th-2-Antwort und den Verlauf der akuten Pankreatitis hat.

4.5 Inhibition des Inflammasoms durch MCC950 und der Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis

Im weiteren Verlauf sollte getestet werden, ob die Inhibition des NLRP-3 Inflammasoms einen therapeutischen Effekt auf den Verlauf der Pankreatitis haben könnte. Aus diesem Grund wurde MCC950 genutzt. MCC950 ist ein kleines Molekül, welches in der Lage ist, die Bildung des NLRP-3 Inflammasoms zu verhindern⁶². Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Mäuse mit MCC950 zu einer signifikanten Reduktion des Schadens führte, gemessen an den Serum-Spiegel der Amylase und der histologische Analyse der Pankreata (Abbildung 20). Die Kontrolltiere erhielten an Stelle des Inhibitors PBS.

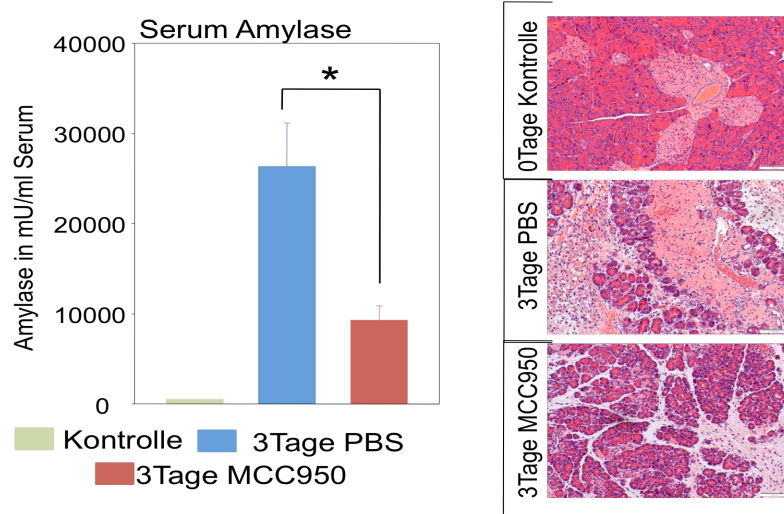


Abbildung 20: Messung der Amylase im Serum nach Induktion der Pankreatitis und Behandlung mit MCC950 und histologische Untersuchung der Pankreata mittels H&E-Färbung

Der systemische Schaden wurde mittels Messung der MPO im Lungenhomogenat und Übersichtsfärbung des Lungengewebes mit Bestimmung der Infiltration von Leukozyten ins Gewebe ermittelt. Auch hier zeigte sich, wie bereits in den NLRP-3- und IL-18 knockout Mäusen eine signifikante Reduktion der systemischen Immunantwort (Abbildung 21).

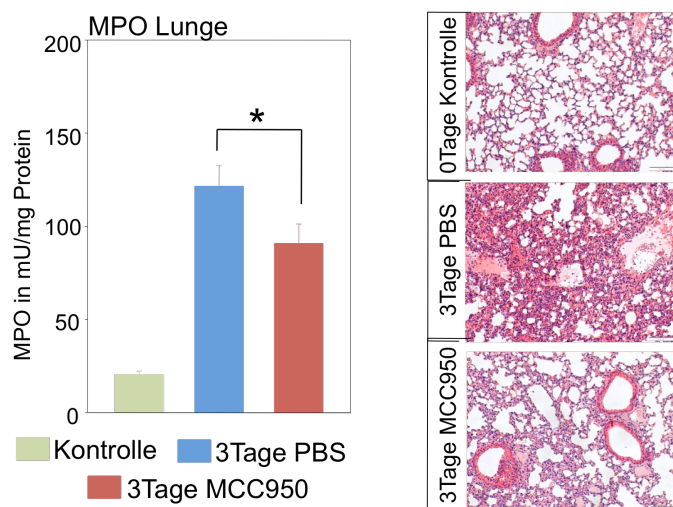


Abbildung 21 : MPO Bestimmung in der Lunge und Histologie der Lunge nach Inhibition der NLRP3 Inflammasom-Komplexes-Formation durch MCC950

Die Untersuchung der adaptiven Immunantwort in der Milz zeigte eine signifikante Unterschied der Aktivierungsmarker CD69 und CD62L auf den T-Zellen bei den mit Inhibitor behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur PBS erhielt (Abbildung 22).

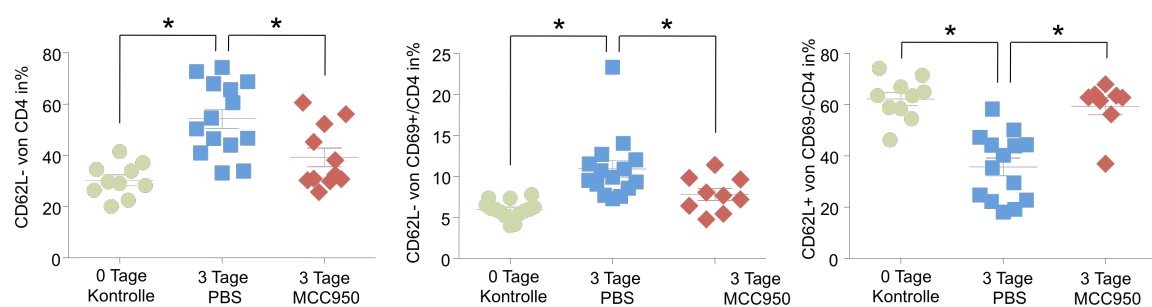


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bestimmung von CD62L und CD69 auf den T-Zellen der Milz von Mäusen nach Induktion der Pankreatitis und Behandlung mit den Inhibitor oder PBS

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Bildung des NLRP-3 Inflammasom-Komplexes durch eine therapeutische Applikation von

MCC950 zu einen signifikanten verringerten Schaden im Verlauf der akuten Pankreatitis führt.

5 Diskussion

Bei der akuten Pankreatitis handelt es sich um Erkrankung, die tödlich verlaufen kann. Sie ist assoziiert mit einer deutlichen Immunantwort, welche zum Organversagen führen kann ⁶³. Die Pankreatitis beginnt in den Azinuszellen, wo es durch die Aktivierung von Proteasen zum Zelltod kommt ⁴⁹ bis hin zum Selbstverdau des Pankreasgewebes ⁶⁴. Dieser Prozess läuft parallel zur Immunantwort ab, welche die Schwere der Erkrankung beeinflusst. Der Verlauf der Pankreatitis ist abhängig zum einen von einer starken überschießenden pro-inflammatorischen Immunantwort (SIRS) und zum anderen durch die zu starke Gegenregulation durch die anti-inflammatorische Immunantwort (CARS). Die Studien in der Vergangenheit haben beschrieben, dass gerade die Aktivierung der adaptiven Immunantwort einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von SIRS und CARS haben ^{65,66}. Durch die hier vorliegende Arbeit sollte gezeigt werden, dass gerade das Zusammenspiel der angeborenen und der erworbenen Immunantwort einen Einfluss auf die Balance zwischen SIRS und CARS haben.

5.1 Aktivierung des adaptiven Immunsystems

Die akute Pankreatitis ist eine sterile Entzündung gefolgt von Infektionen des nekrotischen Gewebes zu einem späteren Zeitpunkt. Die frühe Immunreaktion ist also völlig unabhängig von bakteriellen Antigenen und beruht auf der Freisetzung von DAMPs während des Zelluntergangs ⁶⁷. Hierdurch kommt es zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort bei der Makrophagen eine wesentliche Rolle spielen ⁴⁹. Diese setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, TNFalpha oder IL-1beta frei und führen so zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Aus diesem Grund wurde bei den Untersuchungen eine T-Zell-Antwort vom Typ 1 erwartet, aber die Ergebnisse zeigten eine Th2-Antwort mit Gata3 positiven CD4+-T-Zellen und eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen (FoxP3 positive/ CD25 positive-CD4+-T-Zellen (Daten nicht gezeigt) ⁶¹). Ein Grund hierfür könnte die Abwesenheit von IL-12 sein. Wie schon in anderen Studien gezeigt wurde, führt die Freisetzung von IL-18 ohne die Anwesenheit von IL-12 und IL-23 zu einer

Immunantwort vom Th2-Typ ⁵⁴. Des Weiteren führte die Induktion der Pankreatitis zu einer frühen Aktivierung von T-Zellen, gemessen an den Aktivierungsmarkern CD69 und CD25. Die Aktivierung von CD4 positiven Zellen kann T-Zell-Rezeptor (TCR) abhängig, durch die Präsentation eines spezifischen Antigens erfolgen, aber auch TCR unabhängig durch Zytokine wie IL-12, IL-18 und Typ I Interferone von Zellen des angeborenen Immunsystems ^{68,69}. Um den Mechanismus, der in unserem Modell eine Rolle spielt genauer zu untersuchen, erfolgte im weiteren Verlauf der Arbeit die Nutzung von knockout-Modellen.

5.2 Mechanismus der Aktivierung von CD4+-T-Zellen

Sowohl IL-12 als auch IL-23, die von Makrophagen freigesetzt werden, scheinen in diesem Modell der Pankreatitis keine Rolle zu spielen. Dies haben die Untersuchungen in IL-12p40 knockout Mäusen gezeigt. IL-12p40 ist eine essentielle Untereinheit von IL-12p70 und IL-23. Es konnte in den IL-12p40 defizienten Tieren kein Unterschied zu der Immunantwort in Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. Dies unterstützt das Ergebnis, dass in den Wildtyp-Tieren nach Induktion der Pankreatitis eine Th2-Antwort nachgewiesen werden konnte.

Die Freisetzung von DAMPs durch den Zelluntergang von Azinuszellen führt zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasom Komplexes in Makrophagen, welche das geschädigte Gewebe infiltrieren. Im weiteren Verlauf führt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zur Aktivierung der Caspase-1. Die Caspase-1 spaltet pro-IL-18 und pro-IL-1 β in ihre biologisch aktiven Formen. Durch die Kontrolle dieser Zytokine, hat die Caspase-1 einen großen Einfluss auf das angeborene Immunsystem und entstehende Entzündungsreaktionen. Der Einfluss von IL-1 β auf den Verlauf der Pankreatitis wird deutlich in IL-1 β transgenen Mäusen. Diese exprimieren reifes IL-1 β in pankreatischen Azinuszellen und entwickeln im Laufe der Zeit eine chronische Pankreatitis ⁷⁰. IL-1 β hat keinen direkten Effekt auf den Azinuszellschaden sondern ist indirekt für eine überschießende Immunreaktion verantwortlich, welche ihrerseits das Pankreas schädigt ⁷¹. Aber nicht nur durch die Regulation der Zytokine IL-1 β und IL-18 ist die Caspase-1 in der Lage die pro-inflammatorische Immunantwort zu regulieren, sondern auch durch die Induktion der Pyroptosis. Dabei handelt es sich um einen Zelltod, der

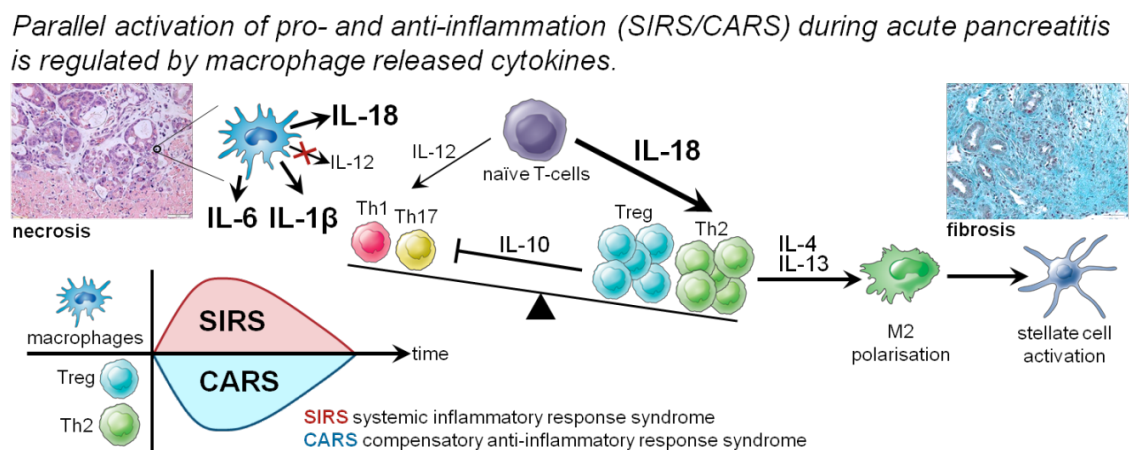
gekennzeichnet ist durch eine schnelle Ruptur der Plasmamembran, die Freisetzung von DAMPs und dadurch eine weitere Induktion der Entzündungsreaktion⁷² über die Aktivierung des Inflammasoms. Hierdurch kann es zu einer überschießenden Immunantwort kommen, die ohne die Anwesenheit von Kontrollmechanismen zu einem SIRS führen kann. Die Abwesenheit des NLRP3-Inflammasoms führte in unserer Arbeit zu einer geringeren Immunantwort und einem signifikant geringeren Schaden im Pankreas. Dies könnte in der Abwesenheit von aktiver Caspase-1 und der damit verbundenden Abwesenheit von pro-inflammatorischen Signalen begründet sein. Diese Vermutung bestätigen die Ergebnisse aus den Versuchen an IL-18 knockout Mäusen. Denn auch hier kam es zu einem mildereren Verlauf der Pankreatitis und keiner signifikanten Erhöhung der Aktivierungsmarker auf CD4+-Zellen. IL-18 ist auch im humanen Modell ein prognostischer Marker für die Induktion einer Entzündungsreaktion im frühen Verlauf der akuten Pankreatitis⁷³.

Die vorangegangenen Untersuchungsergebnisse zeigen einen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung von akuten Pankreatitiden. Die Anwendung von Biologicals hat in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert in der Behandlung von Erkrankungen eingenommen. Die Anwendung eines Antikörpers gegen IL-18 könnte ein interessanter Ansatzpunkt sein. Allerdings stellt hier der Zeitpunkt, wann im Verlauf der Pankreatitis die Applikation erfolgen sollte, eine große Schwierigkeit dar.

5.3 SIRS und CARS zwei getrennt ablaufende Ereignisse?

In den letzten Jahren haben viele Arbeiten gezeigt, dass die anfängliche Annahme, dass es sich bei SIRS und CARS um zwei zeitlich voneinander abzugrenzende Prozesse handelt, nicht stimmt. Dies konnte sowohl durch Transkriptomanalysen als auch durch Daten von Sepsis-Patienten belegt werden^{74,75,76}. Auch in unserem Modell konnte mittels Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass eine pro- und anti-inflammatorische Immunantwort zeitgleich ablaufen und es keine deutliche zeitliche Abgrenzung gibt (Daten nicht gezeigt)⁶¹. Die frühe Aktivierung von T-Zellen konnte bereits in vielen Sepsis-Modellen gezeigt werden. Diese Arbeiten gehen von einer Art Voraktivierung aus. In diesem Status, können die T-Zellen,

wenn sie auf ihr spezifisches Antigen treffen, schneller proliferieren ⁷⁷. Bei einem Ausbleiben des spezifischen Signals gehen die Zellen allerdings in Apoptose und es kommt zu einer verringerten Anzahl von T-Zellen, die eine Immunsuppression erklärt ^{78,79}. Hierbei ist wichtig zu bemerken, dass gerade Effektorzellen in Apoptose gehen, wohingegen regulatorische T-Zellen, die in unserem Modell auch induziert wurden, eine gewisse Apoptoseresistenz aufweisen ⁸⁰. Die induzierten regulatorischen T-Zellen können die Entzündungsreaktion begrenzen und somit immunsuppressiv wirken. Wieder ein Hinweis darauf, dass sowohl Teile des SIRS als auch des CARS parallel ablaufen.



„Quelle: Sessler M, van den Brandt C, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, Homuth G, De Freitas Chama LL, Mishra N, Mahajan UM, Bossaller L, Völker U, Bröker BM, Mayerle J, Lerch MM. *NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Responses in Mice With Acute Pancreatitis*. *Gastroenterology*. 2019 Oct 5. pii: S0016-5085(19)41413-3“

Abbildung 23: Schema zur Regulation der Immunantwort während der akuten Pankreatitis aus der Publikation der eigenen Daten ⁶¹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ausgang der Pankreatitis abhängig ist von der Bildung des NLRP3-Inflammasoms und der daraus resultierenden Aktivierung von IL-18. Eine Blockade des NLRP3-Inflammasoms führt nicht nur zu einem milderen Verlauf der Pankreatitis in unserem Modell, dies konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden ^{81,82–84}. Bei einem immer größer werdenden Stellenwert von Biologicals im klinischen Alltag, könnte das NLRP3-Inflammasom

ein wichtiger Ansatz in der Behandlung der schweren Verläufe in der akuten Pankreatitis sein.

Literaturverzeichnis

1. Rinderknecht, H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig. Dis. Sci.* **31**, 314–321 (1986).
2. Bialek, R., Willemer, S., Arnold, R. & Adler, G. Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **26**, 190–196 (1991).
3. Mayerle, J., Simon, P. & Lerch, M. M. Medical treatment of acute pancreatitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **33**, 855–869, viii (2004).
4. Lankisch, P. G., Karimi, M., Bruns, A., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Temporal trends in incidence and severity of acute pancreatitis in Lüneburg County, Germany: a population-based study. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **9**, 420–426 (2009).
5. Kingsnorth, A. & O'Reilly, D. Acute pancreatitis. *BMJ* **332**, 1072–1076 (2006).
6. Banks, P. A. *et al.* Classification of acute pancreatitis–2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* **62**, 102–111 (2013).
7. Pandol, S. J., Saluja, A. K., Imrie, C. W. & Banks, P. A. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* **132**, 1127–1151 (2007).
8. Müller, F. & Seifert, O. *Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik*. (Springer-Verlag, 2013).
9. FGK_4-14_Hasselblatt_Web.pdf.
10. Carnovale, A. *et al.* Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP J. Pancreas* **6**, 438–444 (2005).
11. GmbH, A.-M. D. A. Lebensbedrohliche akute Pankreatitis. *Pharmazeutische Zeitung online* <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-212011/lebensbedrohliche-akute-pankreatitis/>.
12. Banks, P. A., Conwell, D. L. & Toskes, P. P. The management of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 1–16 (2010).
13. Huber, W. & Schmid, R. M. [Diagnosis and treatment of acute pancreatitis.

Current recommendations]. *Internist* **52**, 823–830, 832 (2011).

14. Wu, B. U. *et al.* Blood urea nitrogen in the early assessment of acute pancreatitis: an international validation study. *Arch. Intern. Med.* **171**, 669–676 (2011).
15. Ahmed, A., Azim, A., Gurjar, M. & Baronia, A. K. Hypocalcemia in acute pancreatitis revisited. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* **20**, 173–177 (2016).
16. Dervenis, C. *et al.* Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* **25**, 195–210 (1999).
17. Lankisch, P. G. *et al.* Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 2081–2085 (2001).
18. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **13**, e1-15 (2013).
19. Arif, A., Jaleel, F. & Rashid, K. Accuracy of BISAP score in prediction of severe acute pancreatitis. *Pak. J. Med. Sci.* **35**, 1008–1012 (2019).
20. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33-40 (2010).
21. Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D. & Castillo Ferrer, C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* **148**, 125–139 (2016).
22. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
23. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
24. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005).
25. Piccinini, A. M. & Midwood, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**, (2010).
26. Benko, S., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine* **43**, 368–373 (2008).

27. Yazdi, A. S., Guarda, G., D’Ombrain, M. C. & Drexler, S. K. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation. *J. Innate Immun.* **2**, 228–237 (2010).
28. Hoque, R., Malik, A. F., Gorelick, F. & Mehal, W. Z. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas* **41**, 353–357 (2012).
29. Iyer, S. S. *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20388–20393 (2009).
30. Louhimo, J., Steer, M. L. & Perides, G. Necroptosis Is an Important Severity Determinant and Potential Therapeutic Target in Experimental Severe Pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 519–535 (2016).
31. Talukdar, R. *et al.* Release of Cathepsin B in Cytosol Causes Cell Death in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **151**, 747-758.e5 (2016).
32. He, S. *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell* **137**, 1100–1111 (2009).
33. Sendler, M. *et al.* Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis. *J. Biol. Chem.* **291**, 14717–14731 (2016).
34. Zong, W.-X. & Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **20**, 1–15 (2006).
35. Gu, H. *et al.* Necro-inflammatory response of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. *Cell Death Dis.* **4**, e816 (2013).
36. Bhatia, M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G189-196 (2004).
37. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L. & Henson, P. M. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 6847–6854 (2001).
38. Davidovich, P., Kearney, C. J. & Martin, S. J. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol. Chem.* **395**, 1163–1171 (2014).
39. Murphy, K. & Weaver, C. Die angeborene Immunität. in *Janeway Immunologie* (eds. Murphy, K. & Weaver, C.) 47–93 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56004-4_2.
40. Gasteiger, G. *et al.* Cellular Innate Immunity: An Old Game with New

Players. *J. Innate Immun.* **9**, 111–125 (2017).

41. Bedoui, S., Gebhardt, T., Gasteiger, G. & Kastenmüller, W. Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. *Nat. Immunol.* **17**, 490–494 (2016).

42. Degn, S. E. & Thiel, S. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand. J. Immunol.* **78**, 181–193 (2013).

43. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).

44. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34 (2011).

45. Grundwissen Immunologie | Christine Schütt | Springer. <https://www.springer.com/de/book/9783827426475>.

46. Murphy, K. & Weaver, C. Die humorale Immunantwort. in *Janeway Immunologie* (eds. Murphy, K. & Weaver, C.) 517–580 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56004-4_10.

47. Boehm, T. & Swann, J. B. Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2**, 259–283 (2014).

48. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5–14 (2005).

49. Sendler, M. *et al.* Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* **154**, 704–718.e10 (2018).

50. Cassel, S. L. & Sutterwala, F. S. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur. J. Immunol.* **40**, 607–611 (2010).

51. Chen, G. Y. & Núñez, G. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* **141**, 1986–1999 (2011).

52. Hoque, R. & Mehal, W. Z. Inflammasomes in pancreatic physiology and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **308**, G643–651 (2015).

53. Kaplanski, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* **281**, 138–153 (2018).

54. Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G. & Dinarello, C. A. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin. Immunol.* **25**, 439–448 (2013).
55. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. & Okamura, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 423–474 (2001).
56. Schneider, A. *et al.* Enhanced expression of interleukin-18 in serum and pancreas of patients with chronic pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **12**, 6507–6514 (2006).
57. Vignali, D. A. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* **13**, 722–728 (2012).
58. Behzadi, P., Behzadi, E. & Ranjbar, R. IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **63**, 1–25 (2016).
59. Teng, M. W. L. *et al.* IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, 719–729 (2015).
60. Cooper, A. M. & Khader, S. A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol.* **28**, 33–38 (2007).
61. Sendler, M. *et al.* NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Responses in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* (2019) doi:10.1053/j.gastro.2019.09.040.
62. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, 248–255 (2015).
63. Mofidi, R. *et al.* Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **93**, 738–744 (2006).
64. Kukor, Z., Tóth, M. & Sahin-Tóth, M. Human anionic trypsinogen: properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2047–2058 (2003).
65. Bhatia, M. & Moochhala, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* **202**, 145–156 (2004).
66. Schmidt, A. I. *et al.* The predominance of a naive T helper cell subset in the

- immune response of experimental acute pancreatitis. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **17**, 209–218 (2017).
67. Hoque, R. *et al.* TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **141**, 358–369 (2011).
68. Nakanishi, K. Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat. Immunol.* **2**, 140–142 (2001).
69. Schmoekel, K., Traffehn, S., Eger, C., Pötschke, C. & Bröker, B. M. Full activation of CD4⁺ T cells early during sepsis requires specific antigen. *Shock Augusta Ga* **43**, 192–200 (2015).
70. Marrache, F. *et al.* Overexpression of interleukin-1beta in the murine pancreas results in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **135**, 1277–1287 (2008).
71. Sandler, M. *et al.* Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut* **62**, 430–439 (2013).
72. Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 99–109 (2009).
73. Janiak, A., Leśniowski, B., Jasińska, A., Pietruczuk, M. & Małecka-Panas, E. Interleukin 18 as an early marker or prognostic factor in acute pancreatitis. *Przegląd Gastroenterol.* **10**, 203–207 (2015).
74. Tang, B. M., Huang, S. J. & McLean, A. S. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit. Care Lond. Engl.* **14**, R237 (2010).
75. Tamayo, E. *et al.* Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur. Cytokine Netw.* **22**, 82–87 (2011).
76. Osuchowski, M. F., Welch, K., Siddiqui, J. & Remick, D. G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 1967–1974 (2006).
77. Jiang, J., Lau, L. L. & Shen, H. Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 4352–4358 (2003).

78. Chang, K. C. *et al.* Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 708–719 (2007).
79. Perl, M., Chung, C.-S. & Ayala, A. Apoptosis. *Crit. Care Med.* **33**, S526-529 (2005).
80. Belkaid, Y. & Rouse, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* **6**, 353–360 (2005).
81. Lu, G. *et al.* Indomethacin inhabits the NLRP3 inflammasome pathway and protects severe acute pancreatitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**, 827–832 (2017).
82. Hou, C. *et al.* Iguratimod (T-614) attenuates severe acute pancreatitis by inhibiting the NLRP3 inflammasome and NF- κ B pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **119**, 109455 (2019).
83. Jin, H.-Z. *et al.* Apocynin alleviates lung injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling in acute pancreatitis. *Int. Immunopharmacol.* **75**, 105821 (2019).
84. Kim, M.-J. *et al.* Fraxinellone inhibits inflammatory cell infiltration during acute pancreatitis by suppressing inflammasome activation. *Int. Immunopharmacol.* **69**, 169–177 (2019).

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis ist eine weit verbreitete gastrointestinale Erkrankung, die assoziiert sein kann mit Multiorganversagen und einer nicht unwesentlichen Mortalität. Die Pankreatitis beginnt mit einer sterilen Entzündung, die eine überschießende inflammatorische Immunantwort (SIRS) induzieren kann. Die dahinter stehenden Mechanismen sind bisher noch nicht verstanden und eine Behandlung aus diesem Grund schwierig.

Um die systemische Immunantwort während der Pankreatitis genauer zu untersuchen, wurde in dieser Studie in unterschiedlichen Mausstämmen (IL-12p40-, NLRP3- und IL-18 knockout Mäuse) eine akute Pankreatitis mittels Gangligatur und der Applikation von Caerulein induziert. Die Aktivierung der erworbenen Immunantwort wurde mittels durchflußzytometrischer Analyse der T-Zellen in der Milz gemessen. Die Differenzierung der T-Zellen zu Th1/Th2/Treg-Zellen wurde durch die Färbung der nukleären Transkriptionsfaktoren Tbet, Gata3 und FoxP3 und CD4+-Zellen untersucht.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des erworbenen Immunsystems abhängig von NLRP3 ist. Während der Pankreatitis zeigte sich eine klare Th2-Antwort in Abwesenheit einer Th1-Antwort. Diese Immunantwort war abhängig von IL-18 in Abwesenheit von IL-12. Die therapeutische Inhibition von NLRP3 zeigte eine deutliche Reduktion der T-Zell-Aktivierung und einen milderen Krankheitsverlauf der Pankreatitis.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die davon ausgehen, dass es erst zu einer überschießenden Inflammation (SIRS) und dann zu einer zu starken Gegenreaktion, Anti-Inflammation (CARS), kommt, konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Pankreatitis SIRS und CARS parallel verlaufen. Durch die Inhibition von NLRP3 kommt es zu einer milderen Immunantwort und milderen Krankheitsverlauf. Aus diesem Grund kann der Einsatz von Inhibitoren gegen NLRP3 ein guter therapeutischer Ansatz für den klinischen Alltag und bei der Behandlung der akuten Pankreatitis sein.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. dest	Destilliertes Wasser
APC	Antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin
ASC	apoptosis-associated speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Beckton Dickinson
BSA	bovine serum albumin
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CC-Motiv	Cystein-Cystein Motiv
CCK	Cholecystokinin
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CXC-Motiv	Cystein-X-Cystein Motiv
DAMP	damage-associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure = DNS)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCAP	Flow Cytometric Analysis Program
FCS	fetal calf serum
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein isothiocyanate

FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
i.p.	Intra peritoneal
ICE	interleukin-converting enzyme
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mg/dl	Milligramm/ Deziliter
mg/l	Milligramm/ Liter
min	Minute
mitDAMP	mitochondrial damage-associated molecular pattern
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
mU/ml	Milliunits/ Milliliter
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
nDAMP	Nuclear damage-associated molecular pattern
NF-kB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NLR	NOD-like receptor

NLRP3	NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3
NOD	Nucleotid-binding Oligomerization Domain
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg
PaO ₂ /FiO ₂	Oxygenierungsindex
PBS	Phosphate buffered saline
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
Per-CP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
pH	potentia hydrogenii
PMA	phorbol myristate acetate
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin Domäne
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure = RNS)
rpm	rounds per minute
RR	Riva Rocci (Blutdruck)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SPINK-1	Serin Protease Inhibitor Kazal Type-1
Tbet	T-box transcription factor
TCR	T-cell-receptor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

6.3 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Ursachenverteilung für die Entstehung einer akuten Pankreatitis.....	8
Tabelle 1: Marshall Score für Organfunktionsstörung	10
Abbildung 2: Aktivierung des Immunsystems bei einer sterilen Entzündung	12
Abbildung 3: Behandlungsschema zur Induktion der akuten Pankreatitis in den Versuchstieren.	25
Tabelle 2: Fluorochrome und Antigene	26
Abbildung 4: Bestimmung der Serum-Amylase und der MPO in der Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten in der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen.....	31
Abbildung 5: Histologie des Pankreas und der Lunge im Verlauf der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen.....	32
Abbildung 6: T-Zell-Aktivierung nach Induktion der akuten Pankreatitis in C57BL/6-Mäusen	33
Abbildung 7: Intrazelluläre Messung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren der T-Zellen im Verlauf der akuten Pankreatitis in der Maus	33
Abbildung 8: Bestimmung der Serum-Amylase und Serum-Lipase in der akuten Pankreatitis in IL-12p40 -/- Mäusen	34
Abbildung 9: Histologische Untersuchung des Pankreas 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in Wildtyp- und IL-12p40-/- Mäusen.	35
Abbildung 10: Histologie der Lunge und Messung der MPO in der Lunge 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis.....	35
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Bestimmung der Aktivierungsmarker 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in Wildtyp- und IL-12p40-/- Mäusen	36
Abbildung 12: Messung der Amylase im Serum und histologische Untersuchung der Pankreata mittel H&E Färbung 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP3 knockout- und Wildtypmäusen	37
Abbildung 13: histologische Untersuchung des Lungengewebes mittels H&E-Färbung und Messung der MPO in Lungenhomogenat 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP-3- knockout- und Wildtypmäusen	37

Abbildung 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der oberflächlichen Aktivierungsmarker CD69, CD25 und CD62L auf T-Zellen der Milz 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis in NLRP-3- knockout- und Wildtyp-Mäusen...	38
Abbildung 15: Bestimmung der Serum-Amylase und Serum-Lipase in der akuten Pankreatitis in IL18-/- -Mäusen	39
Abbildung 16: Histologische Untersuchung des Pankreas mittels H&E-Färbung der IL-18-/- - Mäuse und der Wildtypiere 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis	40
Abbildung 17: MPO Aktivität im Lungenhomogenat und Histologie des Lungengewebes von IL-18-/- -Mäusen und Wildtypmäusen.....	40
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Bestimmung der Aktivierungsmarker auf T-Zellen 3 Tage nach Induktion der Pankreatitis	41
Abbildung 19: Messung der Th1- und Th-2-Antwort durch intrazelluläre Färbung der spezifischen Marker Gata3 (Th2) und Tbet (Th1) 3 Tage nach Induktion der Pankreatiis in IL-18-/- Mäusen und Wildtypmäusen	42
Abbildung 20: Messung der Amylase im Serum nach Induktion der Pankreatitis und Behandlung mit MCC950 und histologische Untersuchung der Pankreata mittels H&E-Färbung.....	43
Abbildung 21 : MPO Bestimmung in der Lunge und Histologie der Lunge nach Inhibition der NLRP3 Inflammasom-Komplexes-Formation durch MCC950....	44
Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bestimmung von CD62L und CD69 auf den T-Zellen der Milz von Mäusen nach Induktion der Pankreatitis und Behandlung mit den Inhibitor oder PBS	44
Abbildung 23: Schema zur Regulation der Immunantwort während der akuten Pankreatitis aus der Publikation der eigenen Daten	49

6.5 Eigene Publikationsliste

Juliane Glaubitz; Anika Wilden; **Cindy van den Brandt**; Frank U. Weiss; Barbara M. Bröker; Julia Mayerle; Markus M. Lerch; Matthias Sendler, Ph.D. *Experimental pancreatitis is characterized by rapid T cell activation, Th2 differentiation that parallels disease severity, and improvement after CD4+ T cell depletion.* Submitted in December in Cellular and Molecular Life Sciences

Aghdassi AA, John DS, Sendler M, Storck C, **van den Brandt C**, Krüger B, Weiss FU, Mayerle J, Lerch MM. *Absence of the neutrophil serine protease cathepsin G decreases neutrophil granulocyte infiltration but does not change the severity of acute pancreatitis.* Sci Rep. 2019 Nov 14;9(1):16774.

Sendler M *, **van den Brandt C ***, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, Homuth G, De Freitas Chama LL, Mishra N, Mahajan UM, Bossaller L, Völker U, Bröker BM, Mayerle J, Lerch MM. *NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Responses in Mice With Acute Pancreatitis.* Gastroenterology. 2019 Oct 5. pii: S0016-5085(19)41413-3.

Sendler M, Weiss FU, Golchert J, Homuth G, **van den Brandt C**, Mahajan UM, Partecke LI, Döring P, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Wagh PR, Lerch MM, Mayerle J. *Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice.* Gastroenterology. 2018 Feb;154(3):704-718

Mahajan UM, Teller S, Sendler M, Palankar R, **van den Brandt C**, Schwaiger T, Kühn JP, Ribback S, Glöckl G, Evert M, Weitschies W, Hosten N, Dombrowski F, Delcea M, Weiss FU, Lerch MM, Mayerle J. *Tumour-specific delivery of siRNA-coupled superparamagnetic iron oxide nanoparticles, targeted against PLK1, stops progression of pancreatic cancer.* Gut. 2016 Nov;65(11):1838-1849.

Schick V, Scheiber JA, Mooren FC, Turi S, Ceyhan GO, Schnekenburger J, Sendler M, Schwaiger T, Omercevic A, **Brandt Cv**, Fluhr G, Domschke W, Krüger B, Mayerle J, Lerch MM. *Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis*. Gut. 2014 Sep;63(9):1469-80.

Schwaiger T *, **van den Brandt C ***, Fitzner B, Zaatreh S, Kraatz F, Dummer A, Nizze H, Evert M, Bröker BM, Brunner-Weinzierl MC, Wartmann T, Salem T, Lerch MM, Jaster R, Mayerle J. *Autoimmune pancreatitis in MRL/Mp mice is a T cell-mediated disease responsive to cyclosporine A and rapamycin treatment*. Gut. 2014 Mar;63(3):494-505.

Mayerle J, Dummer A, Sendler M, Malla SR, **van den Brandt C**, Teller S, Aghdassi A, Nitsche C, Lerch MM. *Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis*. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Mar;27 Suppl 2:47-51.

Köhler A, De Filippo K, Hasenberg M, **van den Brandt C**, Nye E, Hosking MP, Lane TE, Männ L, Ransohoff RM, Hauser AE, Winter O, Schraven B, Geiger H, Hogg N, Gunzer M. *G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands*. Blood. 2011 Apr 21;117(16):4349-57.

Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, **Nitschke C**, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC. *Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy*. J Immunol. 2009 May 1;182(9):5488-97.

Nitschke C, Garin A, Kosco-Vilbois M, Gunzer M. *3D and 4D imaging of immune cells in vitro and in vivo*. Histochem Cell Biol. 2008 Dec;130(6):1053-62. Review.

Yun SW, Kouznetsova E, **Nitschke C**, Heinitz K, Schliebs R, Gerlach M, Riederer P, Klein MA. *beta-Amyloid deposition and prion infection in adult primary brain cell long-term culture model*. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 31;360(3):520-4.

Nitschke C, Flechsig E, van den Brandt J, Lindner N, Lührs T, Dittmer U, Klein MA. *Immunisation strategies against prion diseases: prime-boost immunisation with a PrP DNA vaccine containing foreign helper T-cell epitopes does not prevent mouse scrapie*. Vet Microbiol. 2007 Aug 31;123(4):367-76.

Klötting I, **Nitschke C**, van den Brandt J. *Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats*. Toxicol Appl Pharmacol. 2003 May 15;189(1):68-71.

6.6 Erklärung zur Förderung des Projektes

Die medizinische Promotionsarbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „PePPP: Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen; Teilprojekt 2: “ angefertigt. Die Förderung des Projektes erfolgt aus Mitteln des Europäischen Sozialfonds (ESF) im Rahmen des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbünden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“. (MV ESF/14- BM-A55-0045/16)



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Sozialfonds

6.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Markus Lerch, für die Überlassung des Themas und der sanften Überzeugung zum Durchführen einer zweiten Doktorarbeit. Dadurch war es mir möglich, auch während des Medizinstudiums, das Band zur Forschung nicht gänzlich zu kappen.

Dr. Matthias Sandler möchte ich dafür danken, dass ich immer willkommen war im Labor. Nicht nur für die Durchführung von Experimenten oder Diskussion über Rundzellen, sondern auch, um kurz vor oder nach Prüfungen zu jammern. Wenn diese Arbeit tatsächlich abgegeben ist, wurde aus einem „Running-Gag“ Ernst.

Ein großer Dank geht auch an Kaddi. Du bist nicht nur eine großartige Hilfe im Labor gewesen, sondern eine wichtige Freundin für mich. Ich hoffe, dass wir uns nicht aus den Augen verlieren, auch wenn ich vorerst nicht mehr so häufig ins Labor kommen werde.

Dies ist jetzt hoffentlich kein Plagiat, aber natürlich gilt mein Dank auch in dieser Arbeit wieder Jens. Auch wenn es diesmal zu keinen erwähnenswerten FACS-Katastrophen kam, und ich die nächtlichen Einsätze allein lösen konnte, wäre das nicht möglich gewesen, wenn Du mir nicht den Rücken frei gehalten hättest und in den besagten Nächten und auch Tagen einen tollen Job als Papa gemacht hättest. Du bist tatsächlich auch nach meiner zweiten Doktorarbeit und dem zweiten (nervenaufreibenderen) Studium noch an meiner Seite. Dafür danke ich Dir von Herzen. Ich verspreche, dass kein weiteres Studium folgt.

Der letzte große Dank geht an meine Kinder, die vielleicht noch nicht richtig verstehen, wie sehr sie mich unterstützt haben, meine Eltern, die mich, mit etwas Druck, zum Schreiben der Arbeit ermuntert haben und meine Schwester, die immer ein offenes Ohr für mich hat. Ihr habt in den letzten Jahren mit mir gelitten, häufig vor dem Telefon auf Ergebnisse gewartet und habt euch mit mir gefreut. Ich danke Euch sehr.